

|             |   |
|-------------|---|
| Title       | 試験管内進化法による人工RNA-タンパク質モジュールの<br>取得及びそれを利用した翻訳制御スイッチの構築(<br>Dissertation_全文)                      |
| Author(s)   | 原, 知明   |
| Citation    | Kyoto University (京都大学)   |
| Issue Date  | 2013-05-23  |
| URL         | <a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k17798">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k17798</a> |
| Right       |   |
| Type        | Thesis or Dissertation  |
| Textversion | ETD   |

試験管内進化法による人工 RNA-タンパク質モジュールの取得  
及びそれを利用した翻訳制御スイッチの構築

原 知明

## 目次

|   |    |
|---|----|
| 要旨  | 2  |
| 第一章 序論                                    | 3  |
| 1-1 合成生物学 (synthetic biology)             | 4  |
| 1-2 リボスイッチ (riboswitch) を基盤とした翻訳制御スイッチの開発 | 5  |
| 1-3 試験管内進化法 (セレクション)                      | 7  |
| 1-4 遺伝子発現制御による論理ゲート                       | 8  |
| 第二章 結果                                    | 9  |
| 2-1 人工 RNP モジュールの構築方法                     | 10 |
| 2-2 L7KK を標的とした <i>in vitro</i> selection | 11 |
| 2-3 結合必須配列の特定                             | 12 |
| 2-4 H23 を利用した翻訳制御スイッチの作製                  | 14 |
| 第三章 考察                                    | 33 |
| 3-1 人工 RNP モジュールの取得について                   | 34 |
| 3-2 遺伝子発現制御スイッチ                           | 36 |
| 3-3 オルソゴナル性                               | 38 |
| 材料と方法                                     | 39 |
| 文献  | 47 |
| 謝辞  | 52 |

## 要旨

細胞の機能を人工的に制御することを目的に、転写制御や翻訳制御を利用した人工の遺伝子発現制御スイッチが、Synthetic Biology（合成生物学）分野で開発されてきた。本研究では、天然の RNA-タンパク質複合体（RNP）モジュールを改変し、これを翻訳制御に使用することにより、ヒト細胞内で機能する新しいクラスの翻訳制御スイッチを開発した。天然の RNP モジュールとしては、古細菌のリボソームタンパク質である L7Ae とそれに結合する RNA である C/D box を使用した。まず、L7Ae-C/D box RNP モジュールの X 線結晶構造から、結合に関与していると推定される L7Ae の特定のアミノ酸残基をアラニンに置換することにより C/D box との結合を弱めた L7Ae 変異体を作製した。次に、この L7Ae 変異体に対して試験管内進化法を行い、L7Ae 変異体が C/D box よりも強く結合する RNA アプタマーを取得した。得られた L7Ae 変異体と RNA アプタマー間の結合力は、L7Ae と C/D box 間の結合力と同程度であり、RNA アプタマーは L7Ae 変異体だけでなく L7Ae にも強く結合した。同 RNA アプタマー配列を mRNA に挿入して L7Ae 変異体に応答して翻訳が抑制される翻訳制御スイッチを作製し、HeLa 細胞内で設計通りに新スイッチが機能することを明らかにした。さらにこのスイッチは、天然の L7Ae によっても機能することを確認し、L7Ae 変異体と L7Ae のどちらか一方が存在すると翻訳が抑制される性質を持つ NOR ゲートが形成できることを示した。本方法は、L7Ae-C/D box RNP モジュールのみでなく、他の RNP モジュールにも応用可能であると考えられる。よって、さまざまな新規人工翻訳制御スイッチの作製に有用な情報を与えるものであると考えている。

# 第一章

## 序論

## 1-1 合成生物学 (synthetic biology)

合成生物学は、1) 生体内で機能する人工分子を設計し、これらにより引き起こされる生命現象を解析するという手法により生命の本質を理解し、また 2) 生物を改変、再構築する事を通じて、新しい医療、物質生産、情報の各分野における新手法の開発を行うことを目的とする<sup>1-3</sup>。具体的には、生体分子を生物の基本構成単位として捉え、これらを基に新規機能を持つ分子装置や細胞などを設計し、それらを設計通りに機能させることが基礎技術となっている。設計通りに機能するさまざまな人工装置やそれらにより構成されるシステムを生体で作動させることで、細胞さらには生物そのものについての知見が深められるだけでなく、社会にとって有用な技術としてさまざまな分野に応用されることが期待できる。

合成生物学分野において、これまで報告された代表的な研究は以下のものである。一つは物質生産などの機能を付加された細胞の作製である。その代表例としてエネルギー供給を目的としたアルコール生産大腸菌の開発が挙げられる<sup>4-6</sup>。そのような大腸菌は、アルコールの生産を最大化するために、他の生物種の遺伝子の導入や、効率低下の原因となり得る遺伝子の欠失によって作製される。アルコール以外にはアミノ酸や薬の原料となる化合物生産用の大腸菌も作製されている<sup>7-9</sup>。二つ目として、特定の発現様式を示す人工遺伝子回路の作製が挙げられる。その代表例は、特定の遺伝子の発現量が上昇と下降を繰り返すオシレーション遺伝子回路の作製である<sup>10-12</sup>。理論的にオシレーションを起こすと予測される回路を設計し、実験によって設計通りに回路が機能することを確かめている。予測通りに機能する条件を確認することで、回路構築の理論の発展が期待されている。三つ目は、遺伝子発現制御を行うための分子スイッチの開発が挙げられる。代表例としては RNA 分子による翻訳制御スイッチである<sup>2, 13, 14</sup>。特定の塩基配列や、低分子化合物、タンパク質に応答して翻訳を制御する点が特徴的であり、主にヒト細胞内での使用を目的としている。しかし、ヒト細胞の遺伝子回路を自由自在に操り、医療応

用を目指すという究極の目的を達成するためには、既存の分子スイッチのみでは入力因子となる分子の種類が限られてしまうので、新種の分子スイッチの構築が必要である。

## 1-2 リボスイッチ (riboswitch) を基盤とした翻訳制御スイッチの開発

細胞活動を維持するために細胞の代謝を調節する機構は重要であるが、その構成因子の一つとしてある種の RNA 分子も機能していることが大腸菌での研究により近年明らかにされた<sup>15-17</sup>。この RNA 分子は、代謝関連遺伝子の mRNA の 5' UTR (5' 非翻訳領域) に、特定の代謝産物に結合する RNA 配列が組み込まれた mRNA である。代謝産物が RNA に直接結合することによって RNA の構造が変化し、転写または翻訳が制御されることから、リボスイッチ (RNA による遺伝子発現制御スイッチ) と呼ばれている。現在では、ビタミン B1 の誘導体であるチアミンピロリン酸 (TPP)、フラビンモノヌクレオチド (FMN)、グアニン、アデニン、グリシン、リシン、グルタミンを含む約 20 種類の低分子化合物がリボスイッチのリガンドとして機能することが明らかにされている<sup>18</sup>。大腸菌以外では TPP リボスイッチのみ菌類や植物などの真核生物でも存在していることが確認されたが、ヒト細胞では発見されていない<sup>18</sup>。このように低分子化合物応答型のリボスイッチは主に大腸菌で見つかったが、近年ではタンパク質応答型のリボスイッチがヒト細胞で見つかった<sup>19</sup>。このタンパク質応答リボスイッチは、VEGFA mRNA の 3' UTR の特定領域に hnRNP L (イントロンスプライシング因子) または GAIT complex (翻訳制御因子) が結合することによって、低酸素状態と IFN- $\gamma$  による刺激に応答し、VEGFA mRNA (血管内皮増殖因子-A をコードする mRNA) の翻訳を制御する。

これらの天然のリボスイッチに対し、合成生物学では細胞の機能を人工的に制御するために人工リボスイッチの開発が行われている<sup>2, 14, 20</sup>。これらは、天然のリボスイッチと同様に、リガンドとなる低分子化合物が mRNA 中の結合配列に結合すると、mRNA

の構造が変化し遺伝子発現を制御する。その代表的な例が、テオフィリン応答リボスイッチである<sup>21, 22</sup>。テオフィリンはカフェイン類似体であるが、その結合 RNA 配列が既  
に取得されていたことから<sup>23</sup>、人工リボスイッチの構築に利用された。この RNA 配列  
を mRNA に組み込むことで、テオフィリン結合特異的な翻訳の抑制または活性化が可  
能となった。これらのリボスイッチは大腸菌などの原核生物で機能し、テオフィリンの  
結合によってリボソーム結合配列（Ribosome Binding Site（RBS）または Shine Dalgarno  
（SD）配列）とその周辺部位の分子内二本鎖化または一本鎖化が誘導され、リボソ  
ームへの結合力が変化することによって翻訳を制御している。また、自己切断リボザイム  
とテオフィリン結合 RNA 配列を組み合わせた配列を mRNA の 3' UTR に組み込むこと  
で、ヒト細胞内で機能するテオフィリン応答リボスイッチも作製された<sup>24, 25</sup>。このリボ  
スイッチは、テオフィリンの結合によるリボザイムの活性化、または不活性化によって  
翻訳を制御している。テオフィリン以外では、テトラサイクリンやネオマイシンなど約  
10 種類の低分子化合物が人工リボスイッチの構築に使用されている<sup>26</sup>。

このように低分子化合物応答リボスイッチの開発が進められてきたが、タンパク質に  
応答する翻訳制御スイッチの開発例は、それらと比べると少数である。タンパク質は細  
胞内でシグナル伝達を担う分子であるので、それらに応答できる翻訳制御スイッチは、  
細胞の機能を制御する新たな分子スイッチとして期待できる。そこで RNA-タンパク質  
複合体（RNP）モジュールを使用してタンパク質応答翻訳制御スイッチの作製を試み、  
設計通りにヒト細胞内で機能することを過去の研究で確認した<sup>27-29</sup>。RNP モジュールは、  
あるタンパク質とそれに特異的に結合する RNA 配列から構成され、天然にはリボソ  
ームやスプライソソームなどに存在している<sup>30-34</sup>。そのうちの一つである L7Ae-C/D box  
RNP モジュール<sup>35</sup>を使用した。L7Ae は熱安定性の高い構造を取る古細菌由来のリボソ  
ームタンパク質であり、kink-turn（K-turn）と呼ばれる RNA の折れ曲がり構造や K-loop  
と呼ばれるループ構造に特異的に結合する<sup>36-38</sup>。K-turn 構造は 30 塩基以下の RNA 配列



で形成することが確認されており<sup>39</sup>、その一つである C/D box と L7Ae の解離定数は数 nM である<sup>28</sup>。このように結合力が強く、結合配列が比較的短いことから、L7Ae-C/D box RNP モジュールは翻訳制御スイッチの作製に適格であると考え、C/D box を 5' UTR または開始コドン直後に挿入した mRNA を作製し、L7Ae 結合特異的に翻訳が抑制されることを確認した。その他の翻訳制御スイッチ作製の例として、バクテリオファージ由来のタンパク質である MS2 や、スプライソソームの構成因子の一つであるヒト由来の U1A に応答する翻訳制御スイッチ、NF- $\kappa$ B または  $\beta$ -カテニンに応答してスプライシングを制御する翻訳制御スイッチが作製されている<sup>40,41</sup>。このようにタンパク質応答翻訳制御スイッチの開発も進められているが、細胞のシグナル伝達を自由に改変するという合成生物学の最終目的を達成するためにはそれらの種類は十分とは言えない。

### 1-3 試験管内進化法（セレクション）

試験管内進化法は、ランダム配列を含む RNA やタンパク質などの分子集団（プール）から、特定の活性を持つ分子を選択する実験手法であり、SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法または *in vitro* selection とも呼ばれる<sup>42,43</sup>。より高い活性を持つ分子を得るために、分子集団の作製、活性分子の選択、選択された分子のクローニングという一連の作業を数回から数十回繰り返す。セレクションによって取得された標的分子に結合する分子はアプタマー (aptamer) と呼ばれ、標的分子の検出や活性の制御に利用される<sup>44</sup>。その中で最も実用化が進んだのは VEGF (血管内皮増殖因子) 結合 RNA アプタマーであり、加齢性黄斑変性症の治療薬となった<sup>45</sup>。RNA アプタマー以外では DNA アプタマー、ペプチドアプタマー、リボザイム、リボスイッチなどの機能性分子がセレクションで取得されているが<sup>46-50</sup>、近年ではリボスイッチの構築にもセレクションが利用されている<sup>22,48</sup>。そのようなリボスイッチは、ランダム配列を含みレ

ポータータンパク質をコードする mRNA 発現プラスミドを大腸菌に導入し、リガンドとなる低分子化合物の存在下で高いリボスイッチ活性を示す大腸菌をクローニングするというセレクションによって構築された。また、RNP モジュールを使用することによりタンパク質応答翻訳制御スイッチが作製できることから<sup>28</sup>、セレクションによって特定のタンパク質に結合する RNA アプタマーを取得し RNP モジュールを作製することで、新たな翻訳制御スイッチの開発が可能であると考えられる。

#### 1-4 遺伝子発現制御による論理ゲート

細胞は外的な刺激に適切に応答することで生存し、その細胞が持っている機能を発揮する。その刺激は一種類とは限らず、複数の刺激を同時に受けた場合でも細胞は適切な応答を示さなければならない。そのために利用するのが遺伝子発現制御による論理ゲートである。これは複数の刺激の有無に応答して下流の遺伝子の発現を制御し、複数の刺激という情報を統合する役割を果たしている。合成生物学では、より複雑な遺伝子回路を構築するために論理ゲートの作製が行われている。その例として、二つの因子が存在する時のみ遺伝子の発現がオンまたはオフとなる AND ゲート、どちらか片方が存在すればオンまたはオフとなる OR ゲート、両方存在しない場合にのみオンまたはオフとなる NOR ゲートなどが存在する。現在では主に複数の転写因子を使用することによりそのようなゲートの構築が報告されている<sup>51-55</sup>。翻訳制御を利用したゲートも構築されているが、それらは主に低分子応答リボスイッチを使用しており、タンパク質応答翻訳制御スイッチを使用した例は限られている<sup>56-59</sup>。本研究では既存の RNP モジュールをセレクションで改変し新たな RNP モジュールを作製することで、タンパク質応答翻訳制御スイッチやそれを用いた論理ゲートの構築が可能になることを示す。

## 第二章

### 結果

## 2-1 人工 RNP モジュールの構築方法

既存の RNP モジュールの中には、X 線結晶構造解析され結合に関与するアミノ酸と塩基を特定できるものが存在している。L7Ae-C/D box RNP モジュールもその一つであるので、その結晶構造により得られた情報から、特定のアミノ酸または塩基を変異することで結合力や結合特異性を変化させることができる。この点に着目し L7Ae-C/D box RNP モジュールを改変して人工 RNP モジュールを作製することにした。まず C/D box に対して結合力の弱い L7Ae 変異体を作製する (図 1 左)。K-turn への結合に必要なアミノ酸側鎖を欠いているそのような変異体は、他の多くの L7Ae 結合配列との結合力も弱くなると考えた。次にその変異体に対してセレクションを行い C/D box よりも強く結合する RNA アプタマーを取得する (図 1 中央)。最後にそのアプタマーを挿入した mRNA を作製し、L7Ae 変異体に応答して翻訳が抑制されるかどうかを確認する (図 1 右)。

L7Ae と C/D box の X 線結晶構造から、C/D box と水素結合を形成していると推定されるアミノ酸残基を特定し、その中から 37 番目のリシン (K37) と 79 番目のリシン (K79) を選び、両方をアラニンに置換した変異体 (L7KK と記す) を作製した (図 2)。K37 は  $U_{3n}$  と  $C_{4n}$  (K-turn の各塩基の番号は参考論文<sup>39</sup>に従って付けた) の両方と水素結合を形成し、K79 は  $U_{L3}$  と水素結合を形成すると推定されたので (図 2B)、この二つのリシンをアラニンに置換することによって C/D box との結合力が弱められると考えた。

変異を入れることでどの程度 C/D box への結合力が低下するのかを調べるために、Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) と表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による結合確認実験を行った (図 3)。EMSA では、L7KK と C/D box が結合していることを示すシフトバンドを確認することはできなかった (図 3A)。SPR 法による相互作用解析では、L7KK と C/D box の解離定数 (Kd) は 128nM であることを確認した (図 3B)。L7Ae と C/D box の解離定数 (Kd) は 2.50nM であることから (図 3B)、アラニン置換によって

C/D box との結合力が弱められたことが確認できた。

次に L7KK が C/D box 以外の K-turn または K-loop と結合するかどうかを調べるために、L7Ae に結合することが確認されている天然の K-turn (Kt-15、Kt-7、lysC、SAM Kt) 又は K-loop (H/ACA、sR8C'/D') と L7KK の結合を EMSA で調べた (図 4)。L7Ae ではこれら 6 種類の RNA への結合を確認できたが、L7KK ではそのような相互作用は確認できなかった (図 4)。この実験から、アラニン置換によって様々な配列の K-turn または K-loop に結合するという L7Ae の特徴を L7KK は失っていることが確認できた。したがって L7KK を標的としたセクションを行い L7KK 結合 RNA アプタマーの取得を試みることにした。

## 2-2 L7KK を標的とした *in vitro* selection

30 塩基のランダム配列を含む RNA プールを作製し、セクションを 14 ラウンド行った (表 1)。磁性 Ni-NTA アガロースビーズにヒスチジンタグ融合 L7KK を結合させた後、RNA プールと混合し、磁石を使用して L7KK 結合 RNA を分離した。9 ラウンドまでは RNA を RI ラベルし、RI カウントを測定することでセクション後の RNA の回収率を計算した。1 ラウンドでは回収率は 0.62%であったが、9 ラウンドでは 14.6%となった。7 ラウンドを行う前には L7KK は用いずに磁性ビーズと RNA プールを混合し、磁性ビーズに結合する RNA を除いた。L7KK は RNA の 10 分の 1 の量で基本的にはセクションを行ったので、1 分子の L7KK が 1 分子の RNA と結合すると仮定した場合、その回収率の最大値は 10%である。したがって 9 ラウンドまでに回収率は飽和に達したと推定し、10 ラウンドから 14 ラウンドでは非 RI ラベルの RNA プールを使用し、回収率は観測せず、回収する RNA の配列が一様になることを期待してセクションを行った。

14 ラウンド後の RNA プールをクローニングし、配列解析を行い 38 クローンの配列を得た (表 2)。ランダム配列部分が完全に一致するクローンは E6 と F3、F12 と G11、G3 と G12、H2 と H7 の 4 組のみであったが、38 クローンの配列のうち、29 種の配列で 5'-G/A-AUGA-3' という共通配列が確認できた (表 2)。そのうち 9 種のクローン (D12、G2、G6、G10、H1、H2、H5、H8、H10) と L7KK の結合を SPR 法で測定したところ、Kd は 0.2 から 1.8 nM であった (図 5、表 3)。この結果から、C/D box との結合力と比べて約 100 倍の結合力を持つ L7KK 結合 RNA アプタマーを取得したことが確認できた。また、その結合力は L7Ae-C/D box RNP モジュールと同程度であることも確認できた (図 3B、表 3)。

### 2-3 結合必須配列の特定

L7KK への結合に必要な最小の配列を特定するために、K-turn、G-bulge loop、C-loop、tandem GA loop の 4 つの RNA 構造を予測するためのソフトである RMDetect<sup>60</sup> を用いて、各アプタマーの二次構造を予測した (図 6)。9 種類のアプタマーのうち、D12、G2、H2、H5、H8、H10 の 6 種類は共通配列の AUGA を含んだ領域で K-turn (K-turn<sub>AUGA</sub> と表記する) 構造を形成すると予測された (図 6)。この K-turn<sub>AUGA</sub> で L7KK と強く結合しているかどうかを調べるために、D12、G2、H5 の 3 種類のアプタマーについて、特定の配列を削除した 3 種類の RNA をそれぞれについて作製した (図 7)。D12-1、G2-1、H5-1 (①とする) は、5'末端と 3'末端のどちらか、又はその両方を削除した RNA。D12-2、G2-2、H5-2 (②とする) は①の K-turn<sub>AUGA</sub> 部位を削除した RNA。D12-3、G2-3、H5-3 (③とする) は①のループ部分を削除した RNA である。SPR 法によって各 RNA と L7KK との結合を測定すると、K-turn<sub>AUGA</sub> を含む①と③では結合が確認できたが、K-turn<sub>AUGA</sub> を含まない②では結合が確認できなかった (図 8)。①と③の Kd はオリジナルのアプタ

マー配列の Kd と同程度であった (表 4)。この結果から、K-turn<sub>AUGA</sub> が L7KK との結合に必要な配列であることが示された。

次に K-turn<sub>AUGA</sub> と共通配列である AUGA の両方が結合に必要であることを調べるために、H5 の K-turn<sub>AUGA</sub> 部分のみから成る最小の結合配列 (H23) を作製した (図 9A)。EMSA と SPR 法によって H23 は L7KK に対して H5 と同程度の結合力を示すことが確認できた (図 9B、C、表 3)。次に、AUGA 配列が L7KK の結合に必須であるかどうかを調べるために、H23 変異体 RNA を作製した (図 10A の左)。L2 部位の A を G に置換した H23-L2-G、L3 部位の U を C に置換した H23-L3-C、1b 部位の G を C に置換した H23-1b-C の 3 種類の H23 変異体 RNA について L7KK と EMSA を行ったところ、3 種類とも L7KK との結合を示すシフトバンドは確認できなかった (図 10B)。H23-L2-G と H23-L3-C では RNA のバンドは L7KK との相互作用によって薄く広がったが、H23-1b-C では RNA のバンドに変化は見られなかった。これらの結果から AUGA 配列が L7KK との結合に重要であることが確認でき、その中でも 1b-G は結合に特に重要であることが確認できた。1b-1n/2n-2b 部位の GA/GA 塩基は K-turn の形成に重要な塩基であることが報告されており<sup>39</sup>、そのうちの 1b 部位の G を C に置換することで結合が見られなくなったことから、H23 では K-turn が形成されていると考えられる。

さらに AUGA と L7KK との結合について調べるために、天然の K-turn に変異を入れた RNA を作製した (図 10A の中央と右)。一つは SAM K-turn の L3 部位の C を U に置換した変異体 (SAM Kt-L3-U)、もう一つは Kt-15 の 2b 部位の U を A に置換した変異体 (Kt-15-2b-A) であり、塩基置換によって AUGA 配列を形成した。EMSA によって結合を測定したところ、これらの変異配列 RNA ではよりはっきりとしたシフトバンドが確認できた (図 10C、D)。これらの結果からも AUGA 配列が L7KK との結合に重要であることが示された。最後に H23 と L7Ae との結合を EMSA と SPR 法で測定したところ結合が確認され、その結合力は H23 と L7KK の結合力と同程度であった (図 11)。こ

の結果から H23 は L7KK と L7Ae の両方に結合できるアプタマーであることが示された。

#### 2-4 H23 を利用した翻訳制御スイッチの作製

L7KK-H23 RNP モジュールを使用して HeLa 細胞内で機能する翻訳制御スイッチを作製できるかどうかを調べるために、H23 を挿入した EGFP mRNA 発現プラスミドを作製した (図 12A)。H23 は EGFP をコードする mRNA の開始コドン直後に挿入したが、フレームシフトを起こさないために H23 の 3' 末端に U を 1 塩基加え、合計 24 塩基を挿入した。L7KK をコードする mRNA には IRES (internal ribosome entry sites) と DsRed Express (DsRed Ex) コード配列が含まれており、DsRed Ex をレポーターとして L7KK 発現細胞を識別した。L7KK 発現プラスミドと H23-EGFP 発現プラスミドの両方を HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に蛍光顕微鏡で細胞の蛍光を観察し (図 12B)、FACS で蛍光を測定した (図 12C-E)。H23-EGFP の蛍光はネガティブコントロール (NC) と比較して、L7KK では低下することが確認できた (図 12B、C、E)。この結果から L7KK と H23 の結合によって翻訳が抑制されることが示された。C/D box-EGFP では L7KK に応答して比較的弱く翻訳が抑制される結果が得られたが (図 12B、D、E)、これは *in vitro* で確認された L7KK と C/D box との弱い結合によるものであると考えられる。

L7Ae でも H23-EGFP mRNA の翻訳が抑制できるかどうかを同様に調べたところ、L7Ae の発現によって H23-EGFP の蛍光が低下することが確認できた (図 12B、C、E)。このように H23-EGFP mRNA は L7Kk と L7Ae の両方によって翻訳が抑制されることから、NOR ゲート (2 種類の入力因子のどちらも存在しない場合のみで機能が発現) として機能することが確認できた (図 12F)。

次に 2 種類の mRNA の翻訳を同時に L7KK または L7Ae で制御できるかどうかを調べるために、H23-BFP mRNA 発現プラスミドを作製した (図 13A、B)。L7KK を発現し



た場合は H23-BFP mRNA の翻訳が強く抑制され、C/D box-EGFP mRNA の翻訳は弱く抑制される（図 13A）。L7Ae を発現した場合は H23-BFP mRNA と C/D box-EGFP mRNA の両方の翻訳が強く抑制されるという設計である（図 13B）。H23-BFP mRNA 発現プラスミド、C/D box-EGFP mRNA 発現プラスミド、L7KK または L7Ae 発現プラスミドの 3 種類を HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に蛍光顕微鏡で細胞の蛍光を観察し（図 13C）、FACS で蛍光を測定した（図 13D-F）。L7KK を発現した場合には H23-BFP mRNA の翻訳は抑制され、C/D box-EGFP の翻訳は比較的弱く抑制されることが確認できた。また、L7A を発現した場合にはどちらの mRNA の翻訳も抑制されることが確認できた。これらの結果から、翻訳抑制の程度はタンパク質と RNA の結合の強さに依存していることが示された。H23-BFP mRNA と C/D box-EGFP mRNA の翻訳の抑制の程度は、単独の場合と両方同時の場合で同程度であったことから（図 12E、図 13F）、これらのスイッチは他のスイッチの存在に関わらず独立にかつ設計通りに機能することが示された。

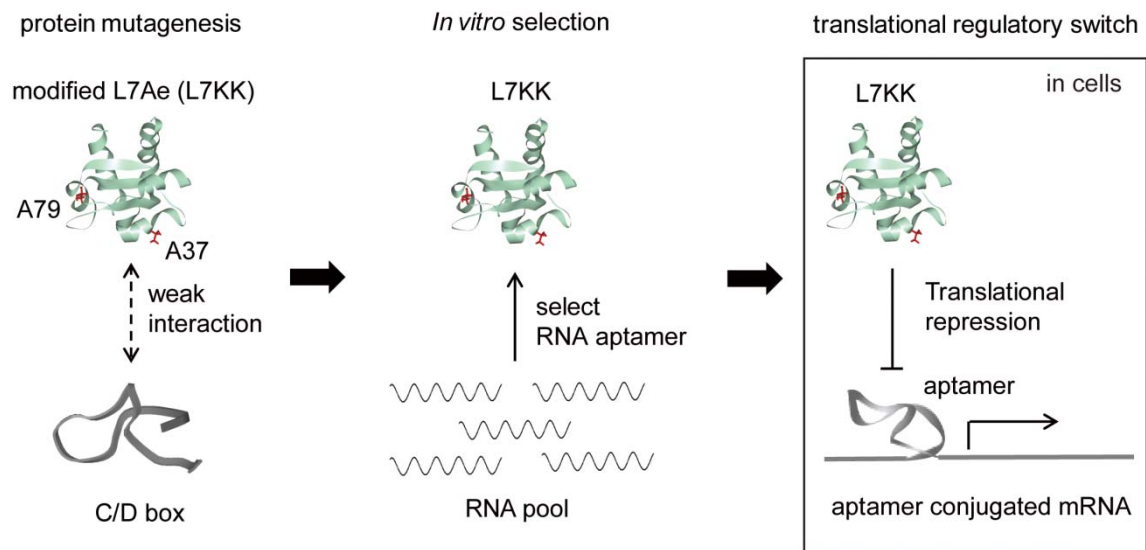


図1 人工 RNP モジュールの構築方法とそれを利用した翻訳制御スイッチの構築

L7Ae-C/D box RNP モジュールを改変することで人工 RNP モジュールを作製する。まず、C/D box との結合力が弱い L7Ae 変異体 (L7KK) を作製する(左)。次にランダム配列を含む RNA プールから、L7KK への結合力が強い RNA アプタマーを取得する(中央)。最後に、取得した RNA アプタマーを挿入した mRNA を作製し、L7KK に応答して翻訳が抑制される翻訳制御スイッチを構築する(右)。

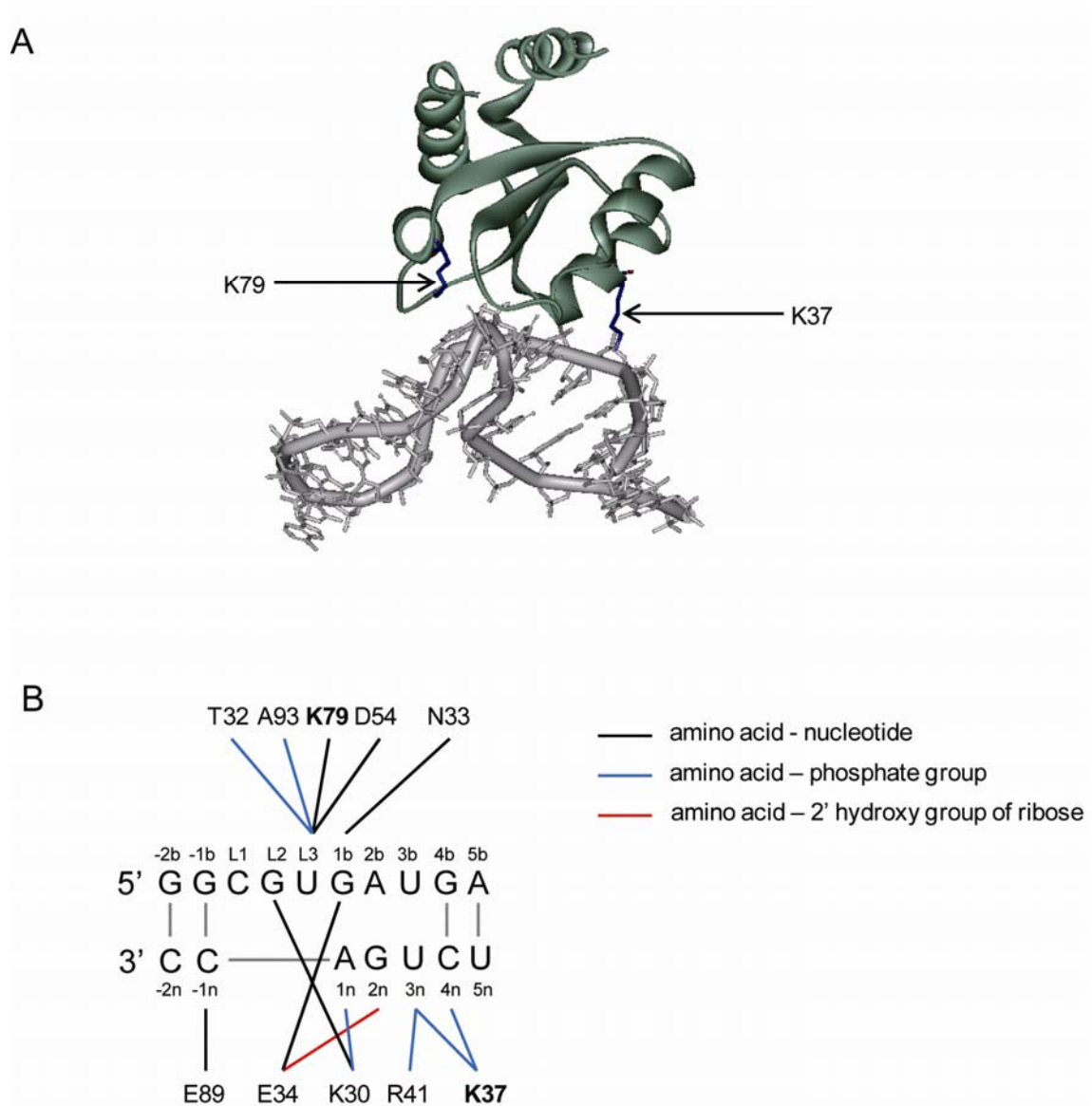
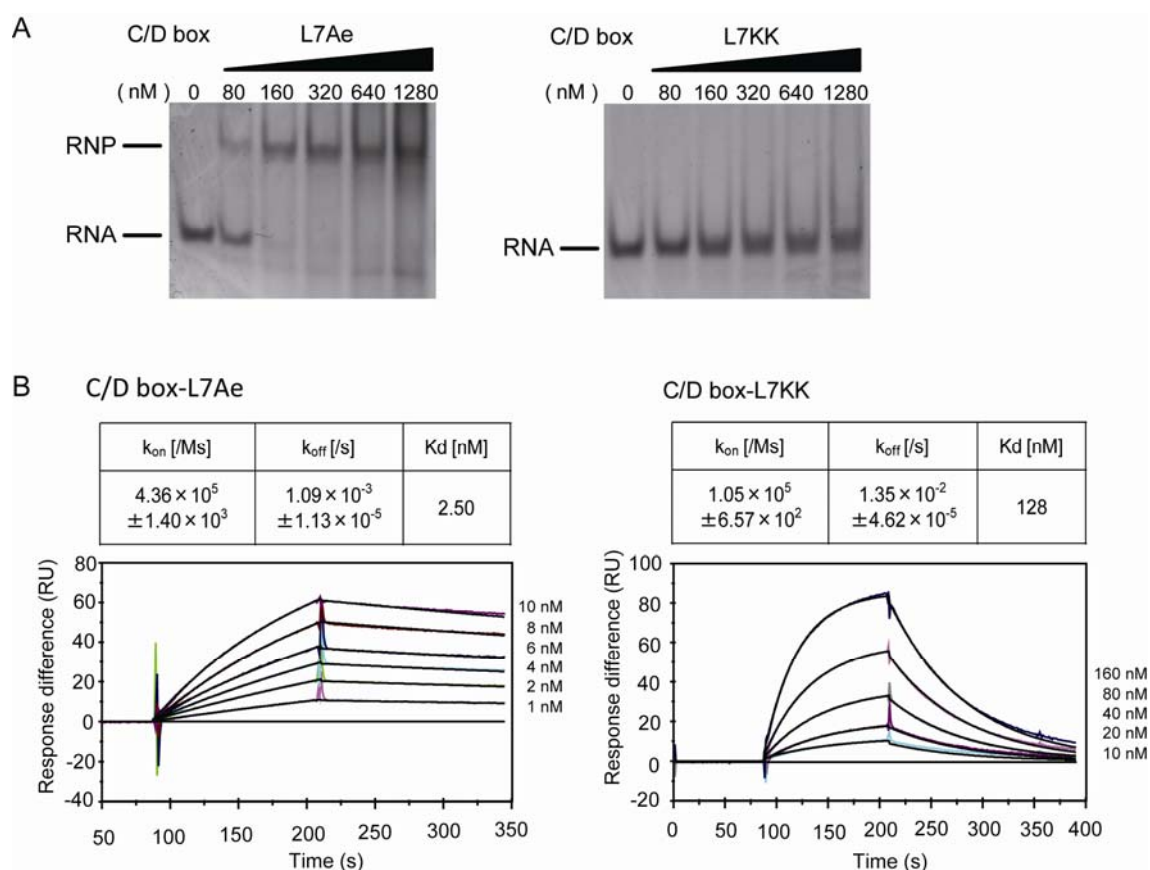


図2 L7Ae と C/D box の相互作用

(A) L7Ae と C/D box の X 線結晶構造 (PDB ID 1RLG) における K37 と K79 の位置。  
 (B) X 線結晶構造から Discovery Studio (Accelrys) を使用して推定される L7Ae と C/D box の間で形成される水素結合。



**図3 L7Ae または L7KK と C/D box との結合測定**

(A) 40nM の C/D box-shRNA と各濃度 (0、80、160、320、640、1280 nM) の L7Ae または L7KK との EMSA。RNA は SYBR Green で染色。

(B) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による相互作用測定。CM5 センサーチップに L7Ae または L7KK を固定化し、各濃度の C/D box-shRNA (L7Ae では 0、1、2、4、6、8、10 nM、L7KK では 0、10、20、40、80、160 nM) を流路に流した。0 nM の測定曲線をベースラインとしている。黒色の曲線は BIAevaluation ソフトによって計算されたフィッティング曲線である。RNA は 90s から 210s まで流した。

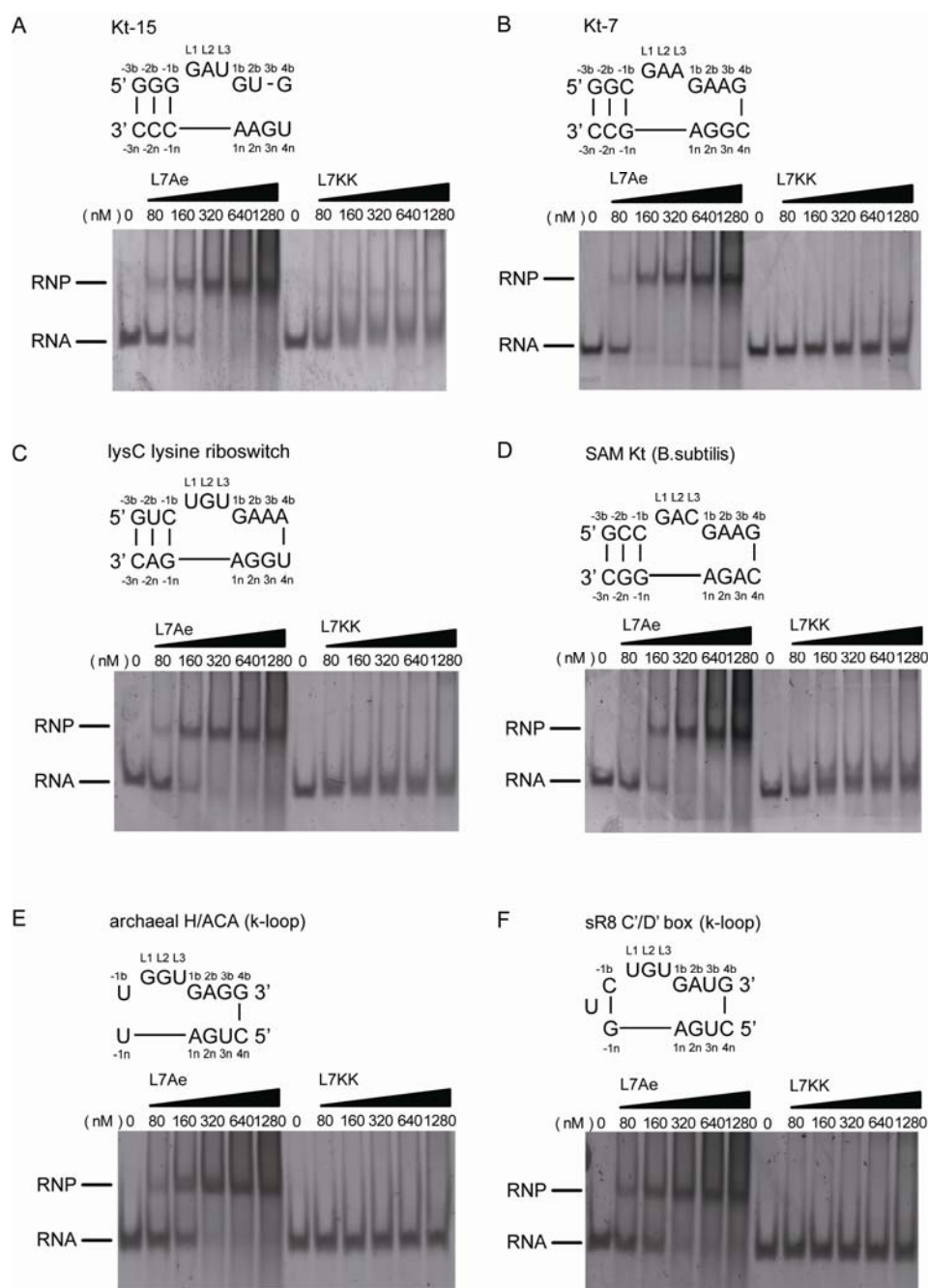


図4 天然に存在する K-turn または K-loop と、L7Ae または L7KK との EMSA (A-F) Kt-15、Kt-7、lysC lysine riboswitch、SAM Kt (*B. subtilis*) は kink-turn (K-turn) 構造をとる RNA、archaeal H/ACA と sR8 C'/D' box は K-loop 構造をとる RNA である。RNA 濃度は 40 nM、タンパク質濃度は 0、80、160、320、640、1280 nM である。RNA は SYBR Green で染色。各 RNA の K-turn または K-loop 部位の配列はゲル図の上に記した通りである。

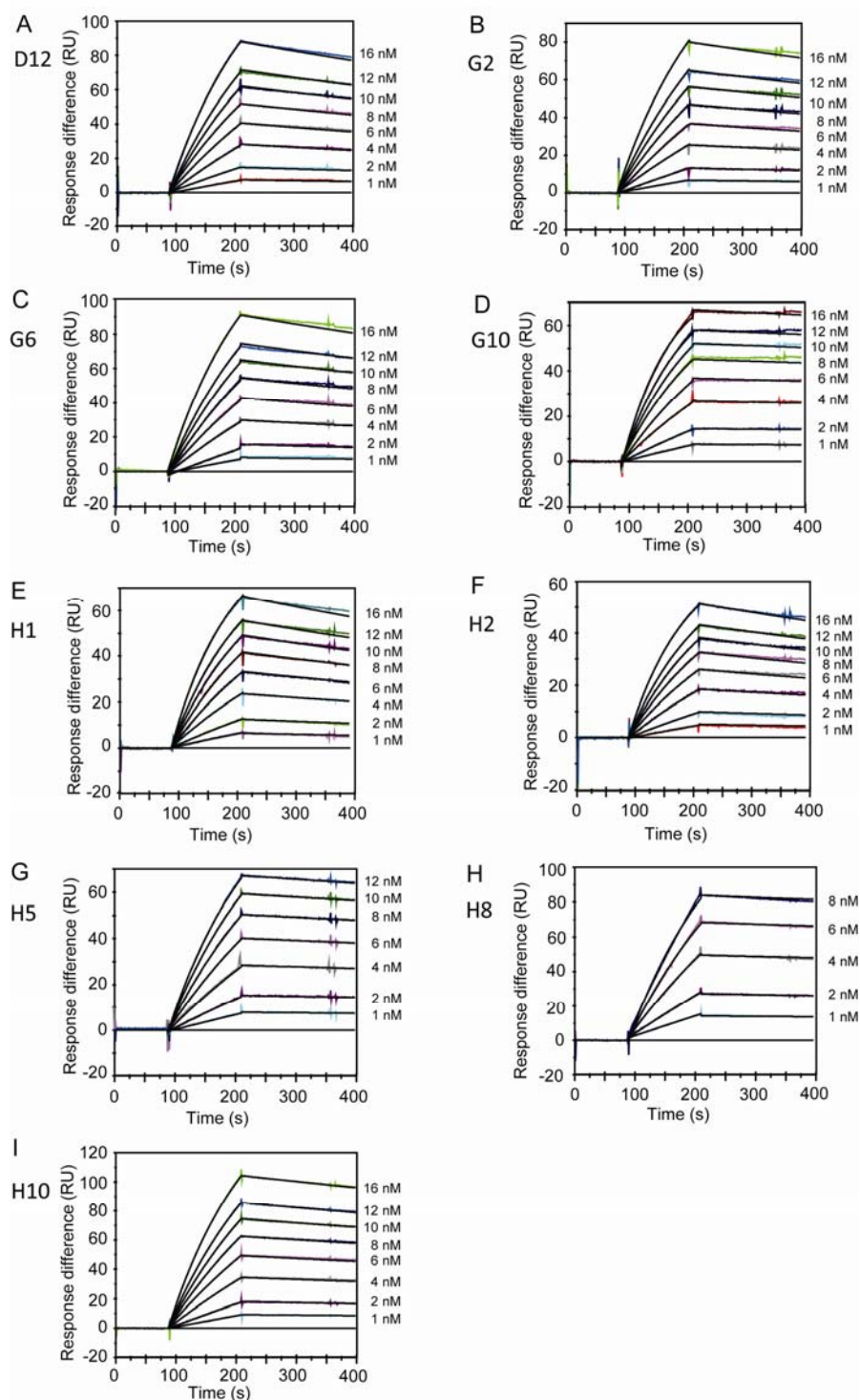


図5 SPR法によるL7KKと9種類のRNAアプタマー(D12、G2、G6、G10、H1、H2、H5、H8、H10)の結合曲線

(A-I) L7KKをCM5センサーチップに固定化し、図に示した各濃度のRNAを流路に流した。0 nMの測定曲線をベースラインとしている。黒色の曲線はBIAevaluationソフトによって計算されたフィッティング曲線である。RNAは90sから210sまで流した。





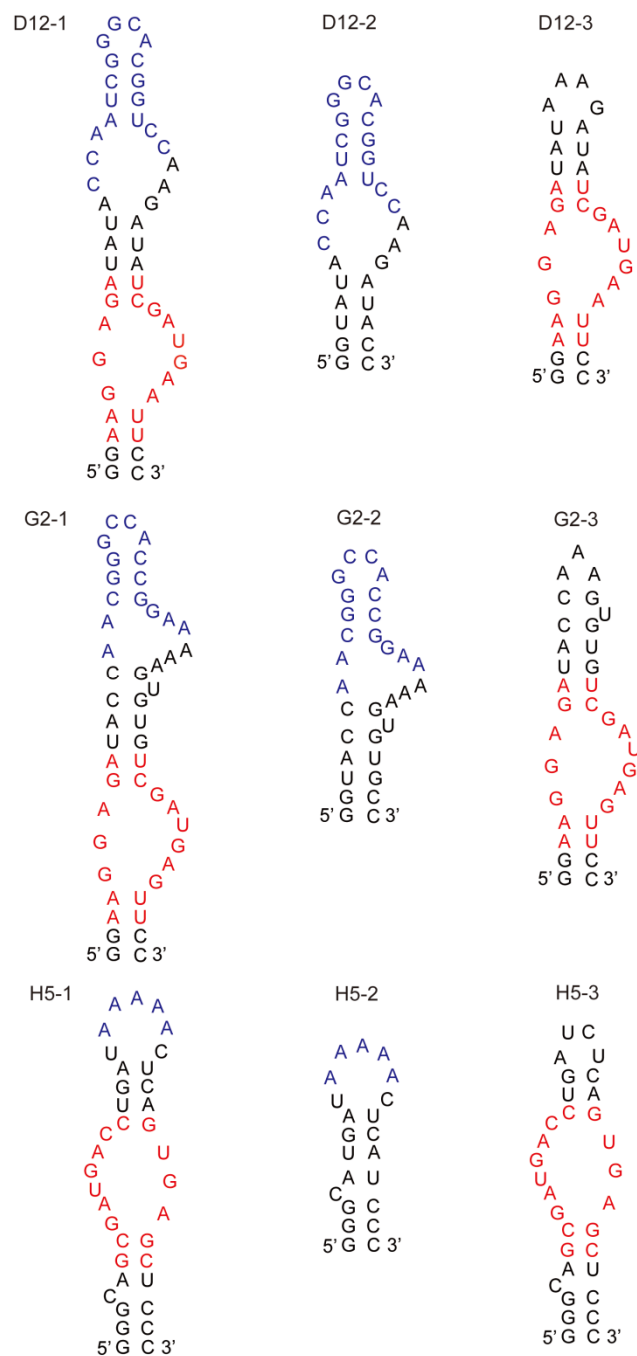


図7 D12、G2、H5の一部分から成るRNAの二次構造

D12、G2、H5の推定されるK-turn構造を赤色、ループ配列を青色で示す。D12-2、G2-2、H5-2はK-turnを含まない。



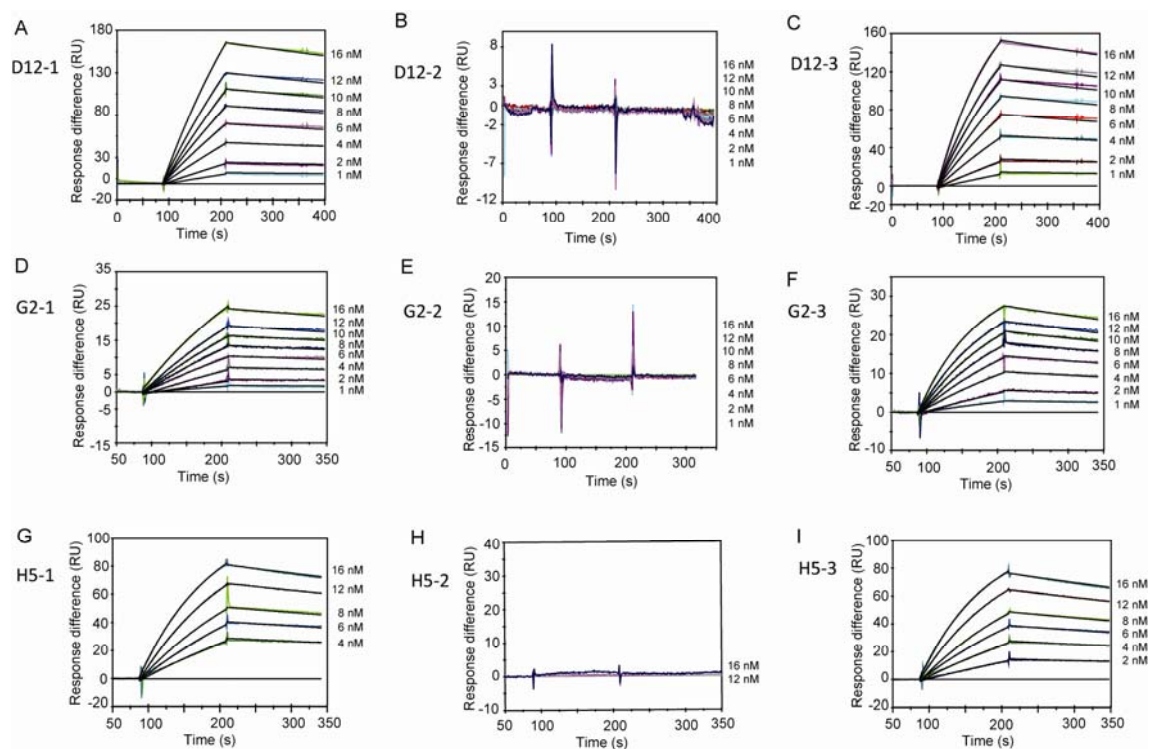
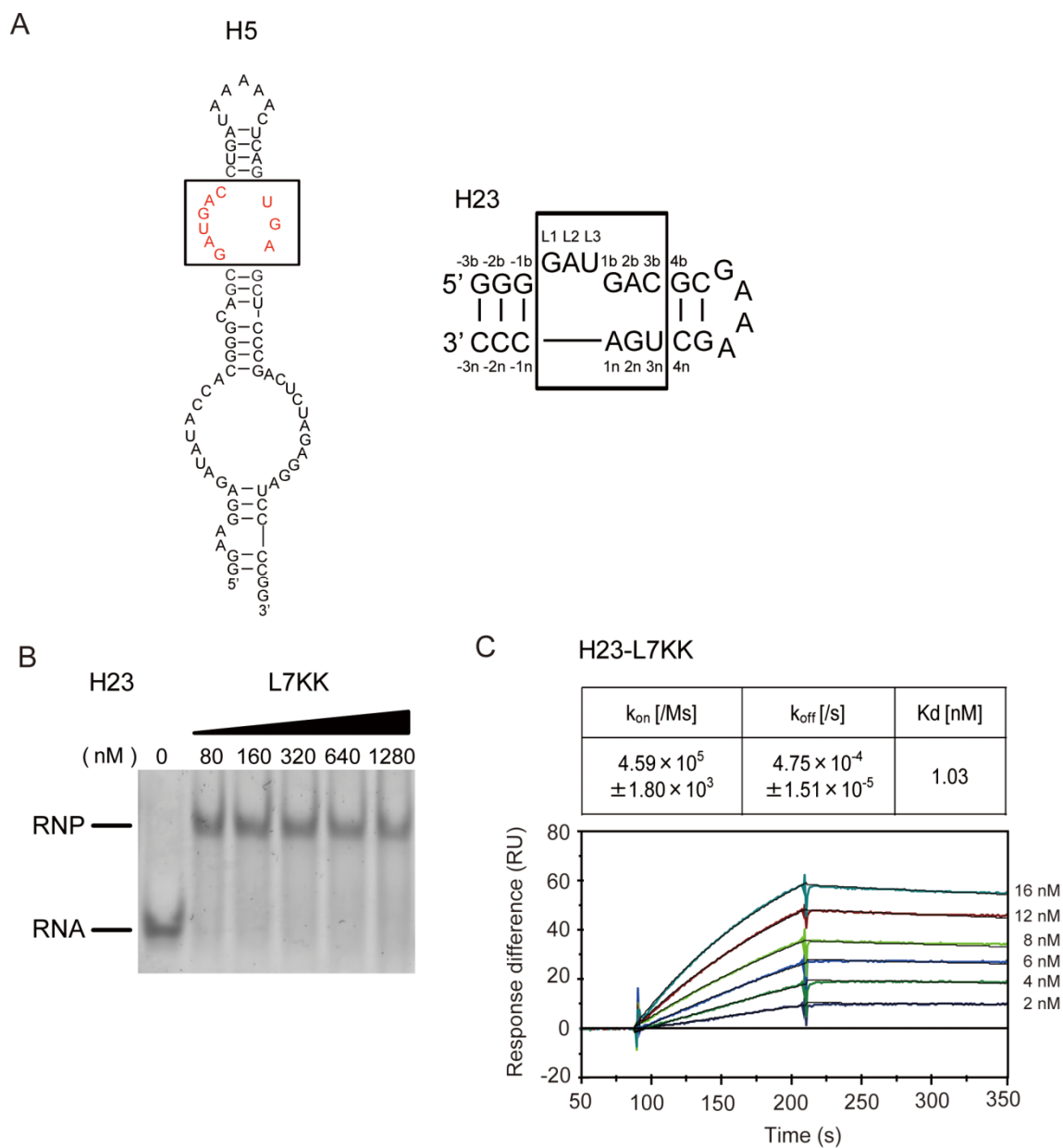


図8 SPR法によるL7KKと分割したRNAアプタマーの結合曲線

(A) D12の末端配列を削除したRNAであるD12-1の結合曲線。(B) D12の末端とK-turn配列を削除したRNAであるD12-2の結合曲線。(C) D12の末端とループ配列を削除したRNAであるD12-3の結合曲線。(D) G2の末端配列を削除したRNAであるG2-1の結合曲線。(E) G2の末端とK-turn配列を削除したRNAであるG2-2の結合曲線。(F) G2の末端とループ配列を削除したRNAであるG2-3の結合曲線。(G) H5の末端配列を削除したRNAであるH5-1の結合曲線。(H) H5の末端とK-turn配列を削除したRNAであるH5-2の結合曲線。(I) H5の末端とループ配列を削除したRNAであるH5-3の結合曲線。L7KKをCM5センサーチップに固定化し、図に示した各濃度のRNAを流路に流した。0 nMの測定曲線をベースラインとしている。黒色の曲線はBIAevaluationソフトによって計算されたフィッティング曲線である。RNAは90sから210sまで流した。



**図 9 取得した RNA アプタマーの配列と L7KK への結合力**

(A) セレクションで取得した H5 アプタマーの二次構造と、その K-turn 配列のみから成る H23 の配列。黒枠で囲った部分が K-turn 構造をとり、両者の共通の配列となっている。H23 の各塩基の番号は K-turn 構造の定義に基づいている。(B) H23-shRNA と L7KK との EMSA。RNA は 40 nM、タンパク質は 0、80、160、320、640、1280 nM である。RNA は SYBR Green で染色。(C) SPR 法による H23 と L7KK の結合測定。L7KK を CM5 センサーチップに固定化し、図に示した各濃度の RNA を流路に流した。0 nM の測定曲線をベースラインとしている。黒色の曲線は BIAevaluation ソフトによって計算されたフィッティング曲線である。RNA は 90s から 210s まで流した。

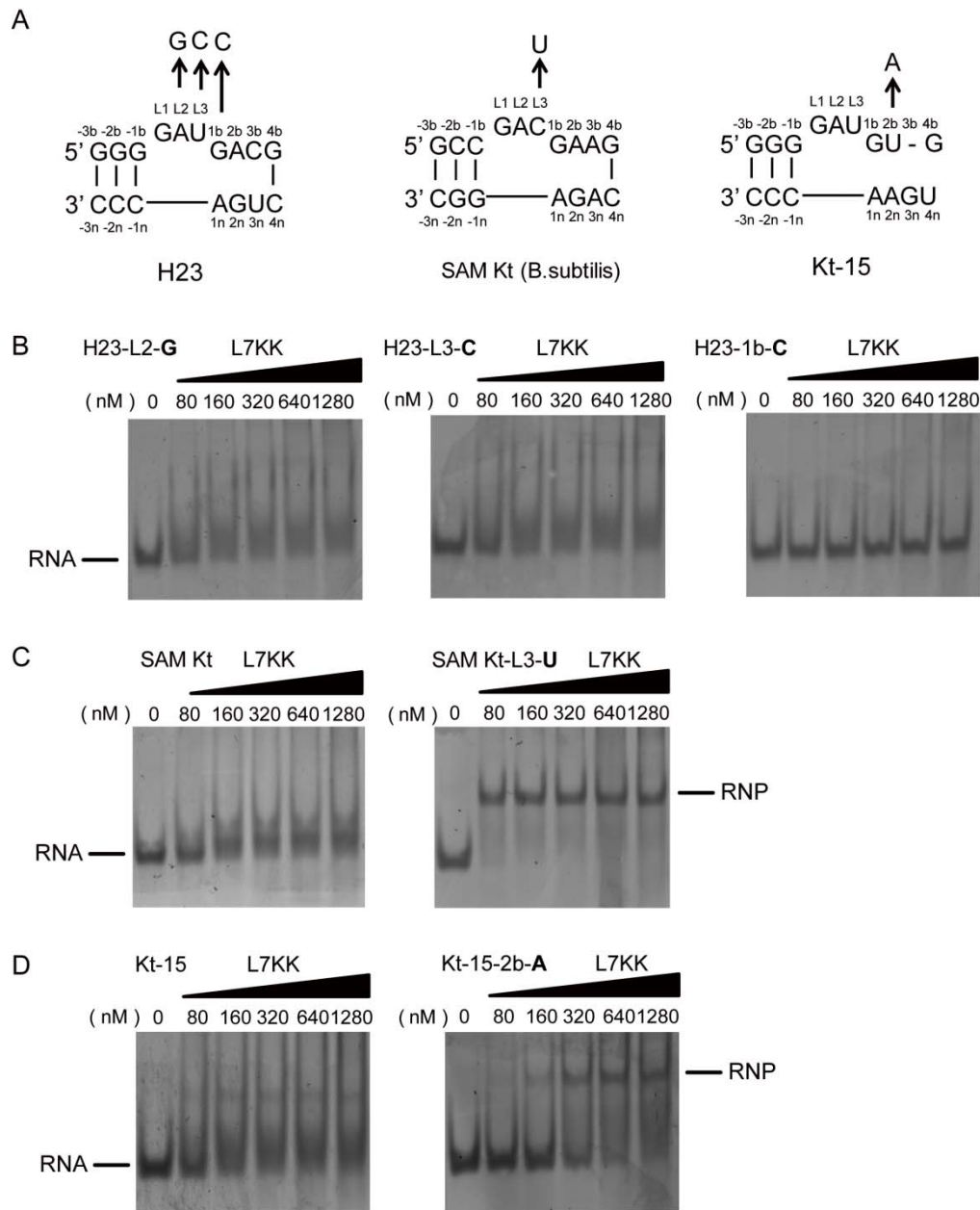
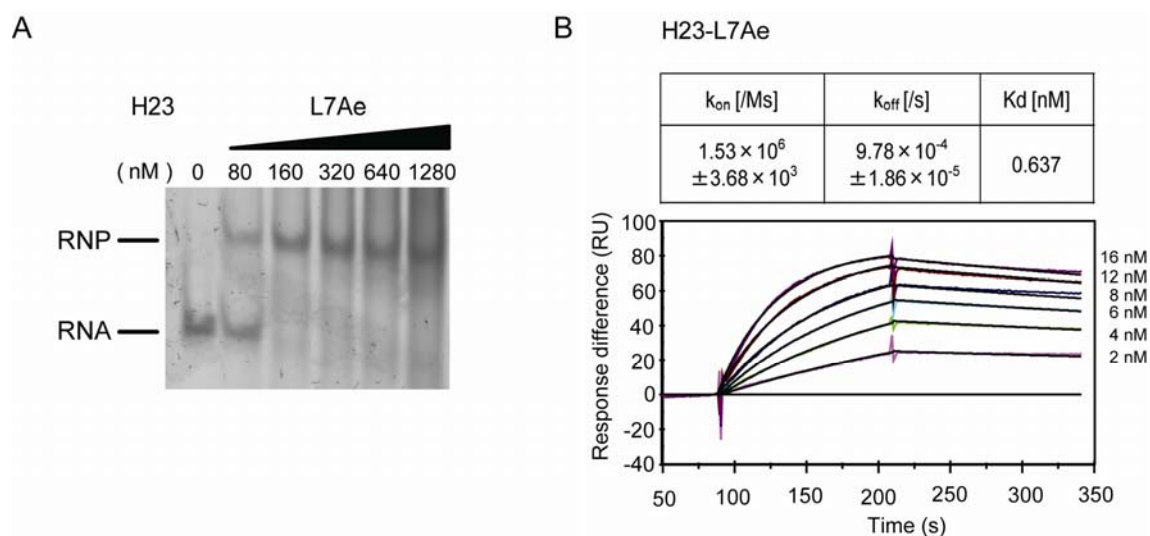


図 10 L7KK と H23 変異体または K-turn 変異体との EMSA

(A) H23 変異体は 3 種類 (H23-L2-G、H23-L3-C、H23-1b-C)、K-turn 変異体は 2 種類 (SAM Kt-L3-U、Kt-15-2b-A) 作製した。H23 変異体ではアプタマーの共通配列を変化させ、K-turn 変異体では変異によってアプタマーの共通配列を導入した。(B) 40 nM の H23-shRNA 変異体と、図に示す濃度の L7KK との EMSA。(C) 40 nM の SAM Kt (-L3-U)-shRNA と、図に示す濃度の L7KK との EMSA。(D) 40 nM の Kt-15 (-2b-A)-shRNA と、図に示す濃度の L7KK との EMSA。RNA は SYBR Green で染色。



**図 11 L7Ae と H23 アプタマーとの結合測定**

(A) 40 nM の H23-shRNA と L7Ae との EMSA。L7Ae 濃度は図に示す通り。RNA は SYBR Green で染色。(B) SPR 法による H23 と L7Ae との結合測定。L7Ae を CM5 センサーチップに固定化し、図に示した各濃度の RNA を流路に流した。0 nM の測定曲線をベースラインとしている。黒色の曲線は BIAevaluation ソフトによって計算されたフィッティング曲線である。RNA は 90s から 210s まで流した。

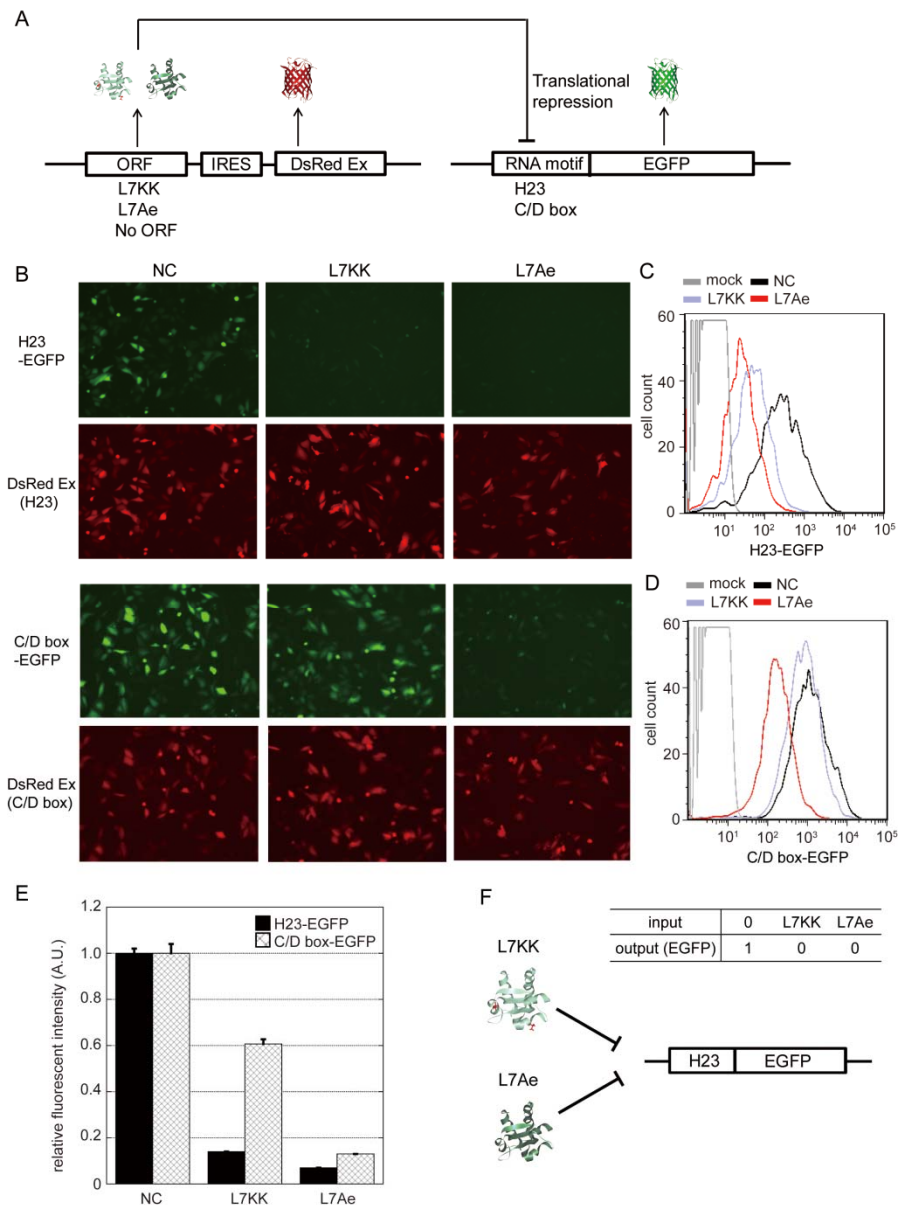


図 12 HeLa 細胞内での翻訳抑制

(A) 翻訳抑制の原理を示した図。H23 または C/D box が挿入された EGFP mRNA は、それぞれ L7KK または L7Ae による結合によって翻訳が抑制される。IRES によって発現する DsRed Ex はトランスフェクションされた細胞のマーカースとして。ネガティブコントロール (NC) 用のタンパク質発現プラスミドは ORF 部分を含まず、L7Ae も L7KK も発現しない。(B) 蛍光顕微鏡写真。全量 0.6  $\mu\text{g}$  のプラスミド (pH23 (C/D box)-EGFP mRNA 0.1 $\mu\text{g}$  と、pNC (0.5  $\mu\text{g}$ ) または pL7KK (0.2 $\mu\text{g}$ ) と pNC (0.3  $\mu\text{g}$ ) または pL7Ae (0.2 $\mu\text{g}$ ) と pNC (0.3  $\mu\text{g}$ )) をトランスフェクションし、24h 後に撮影した。(C、D) DsRed ポジティブ細胞における EGFP 蛍光強度を横軸とするヒストグラム。トランスフェクションしてから 24 時間後に FACS で測定。(E) DsRed ポジティブ細胞の EGFP 蛍光強度の平均値の相対値。(F) L7KK と L7Ae によって制御される NOR ゲートの概念図。

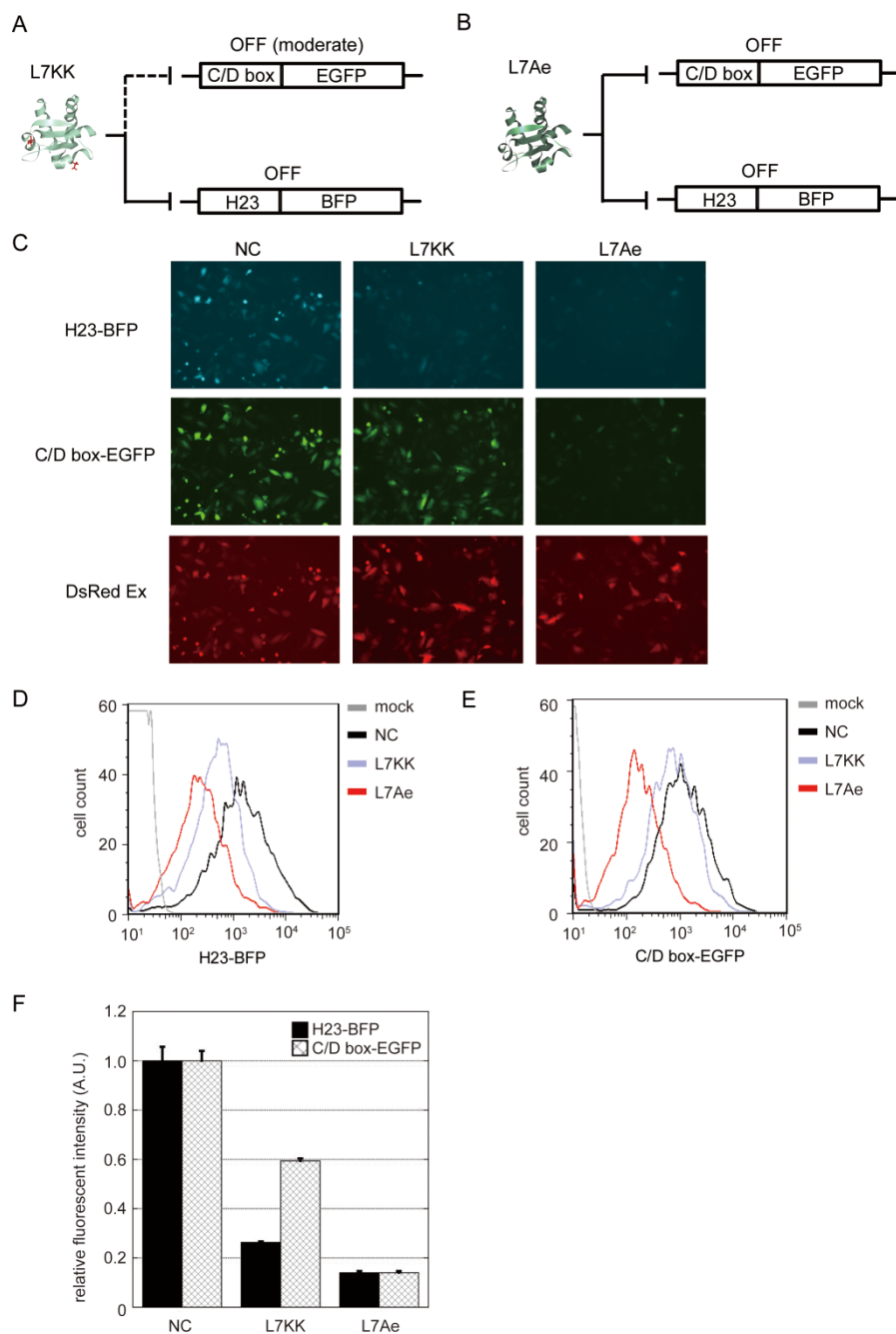


図 13 2 種類の mRNA の翻訳を同時に制御

(A、B) C/D box 挿入 EGFP mRNA と H23 挿入 BFP mRNA の翻訳を L7KK のみ、または L7Ae のみで制御する。L7KK と C/D box-EGFP mRNA の組み合わせのみ翻訳の抑制効果は小さい。(C) 蛍光顕微鏡写真。全量 1.0 $\mu$ g で 3 種類のプラスミド (pL7KK または pL7Ae (0.6 $\mu$ g)、pH23-BFP (0.2 $\mu$ g)、pC/D box-EGFP (0.2 $\mu$ g)) をトランスフェクションし、24 時間後に撮影。(D、E) DsRed ポジティブ細胞における BFP または EGFP 蛍光強度を横軸とするヒストグラム。トランスフェクションしてから 24 時間後に FACS で測定。(F) DsRed ポジティブ細胞の BFP または EGFP 蛍光強度の平均値の相対値。

表 1 セレクション条件

| Cycle | RNA pool (pmol) | L7KK (pmol) | total volume (μM) | % captured |
|-------|-----------------|-------------|-------------------|------------|
| 1     | 500             | 50          | 200               | 0.62       |
| 2     | 300             | 30          | 200               | 1.87       |
| 3     | 200             | 20          | 200               | 5.56       |
| 4     | 200             | 20          | 200               | 5.60       |
| 5     | 200             | 20          | 200               | 7.52       |
| 6     | 200             | 20          | 200               | 6.91       |
| 7     | 168             | 20          | 200               | 10.99      |
| 8     | 100             | 10          | 100               | 8.94       |
| 9     | 100             | 10          | 100               | 14.55      |
| 10    | 200             | 40          | 200               | -          |
| 11    | 200             | 40          | 200               | -          |
| 12    | 200             | 20          | 200               | -          |
| 13    | 200             | 20          | 200               | -          |
| 14    | 200             | 20          | 200               | -          |

1 ラウンドから 9 ラウンドでは  $^{32}\text{P}$  ラベルした RNA プールを使用し、RI カウントを測定することで回収率を計算。10 ラウンドから 14 ラウンドまでは非 RI ラベルの RNA プールを使用し回収率は確認していない。7 ラウンドの前にネガティブセレクションを行い、ビーズに結合する RNA を除去した。



表 2 取得された RNA 配列

| ID      | sequences   |
|---------|---|
| D12     | AUCGGG  CACGGUCCAAGAUAUCAUGAUAUCCAGUC  CUC            |
| E1      | AUGCGG  CGUAUCA <u>AAUGA</u> CUUCCCUACUCCUCUGGGU  CCU |
| E2      | AUGAUG  GCGCAUCGCCGAGGGACCCUUUCCAUCU  CUC             |
| E3      | CGGGCA  GCUGAGGACCCAACCCC <u>GAUGA</u> CGCUCG  CCC    |
| E4      | AUGCGA  UCGGAAGCA <u>AAUGA</u> CUAAUGUGUAAGUUCU  CCU  |
| E5      | UGGGGG  UGAGCCUCCUGGC <u>GAUGA</u> CCCCCGCUUC  CUC    |
| E6, F3  | AUGGGG  GAGGGCC <u>GAUGA</u> AUGCAAGACAGCAGGAGG  CCU  |
| E8      | AUAGGG  CUGGCAUGACGACGUAAG <u>GAUGA</u> CUCACGG  CCA  |
| E9      | AAGGGC  CGCGG <u>GAUGA</u> UGGCUAAACAUGCCGGAUC  GCG   |
| E10     | ACGGGG  AUGCC <u>AAUGA</u> CAGAAGUCACUCCUUGCCAU  CUC  |
| E11     | AGGGAG  CGAACCAAGGAUGGCGAGGCAUGCUUUCU  CCA            |
| E12     | AUGAGG  CAGCGAGCAUACCAUUAACGGUUGC  AAU                |
| F2      | AUGAGG  CUGUAUC <u>GAUGA</u> AUUCUCCGUGCCUCUAGG  CCU  |
| F5      | AAGGGG  UCGGCCGCCGACGCAG <u>GAUGA</u> UGGCGU  CCC     |
| F6      | ACGGGG  CGACGCAAG <u>GAUGA</u> CCCCCGCCUCUAGGCA  CCU  |
| F7      | AAGGGG   <u>GAUGA</u> CAGGCCCAAGCUCUAAGGUUGUGGG  CUC  |
| F8      | AUGAGG  CAGGA <u>GAUGA</u> UGUCAAUACAACGACUGAU  CCU   |
| F9      | AACGGC  GACCC <u>GAUGA</u> CGGAGCACUACGCUUUCAG  CCA   |
| F10     | AUGGGG  AGCGAACAGC <u>GAUGA</u> UCCAAAGACCUUCCC  CUC  |
| F11     | AUGACG  UGACUCCCCGAGGUAACUCGCCUCCCUAUC  CUC           |
| F12,G11 | AUGCGG  CAACCCCGUUCGUAAUUAUC <u>GAUGA</u> UUUCCC  CGG |
| G2      | ACGGGC  CACCGGAAAAAGUGUAUGUC <u>GAUGA</u> GUUCC  CCG  |
| G3,G12  | AUGGAG  CUGGCCGACGUGGUACUCCUAG <u>GAUGA</u> CG  CCA   |
| G4      | UGGGGG  UACGGGGCGAGCAGAUUUGCGAUGUCCGU  CUC            |
| G5      | AUAGGG  CAUC <u>AAUGA</u> CGUGGAAAAUUUACACUGAC  CUC   |
| G6      | UGGGGA  ACC <u>GAUGA</u> AGGAGCUUACCGGUGCCCUUC  CCC   |
| G7      | AUCGGG  CGAGCAACAGC <u>GAUGA</u> ACCCGCCCUCUUC  CCG   |
| G8      | AUGGGG  AGCGAAGAGCGAUGAUCCAAAGACCUUCCC  CUC           |
| G9      | ACGGGG  ACCC <u>AAUGA</u> CAUGAGCAAAAUCCCUACCUU  CCC  |
| G10     | AUGCGU  GCAAUACCAUGGGUGUGUC <u>GAUGA</u> UCUCCG  CCG  |
| H1      | ACGGGG  AAGACUCCCGGCAUUC <u>GAUGA</u> ACUCCAAG  CCC   |
| H2,H7   | ACGGGG  UCGCGCUGACCACACACAAGUGG <u>GAUGA</u> CG  CAC  |
| H3      | AUGAGG  CGGACCAACUCACGCGGAGGUGACCCUCCC  CCG           |
| H4      | AUGGAG  ACGGAAG <u>GAUGA</u> ACCUUGGAUAUCUUCUCC  CCC  |
| H5      | CGGGCA  GC <u>GAUGA</u> CCUGAUAAAAACUCAGUGAGCU  CCC   |
| H6      | AUGAGG  CACCAGACCGAGUUUAUUUCCGCCGGA  CUC              |
| H8      | AUGAGG  CAAGAUACGCGGAGGUAGUCUCCCAACCU  CUC            |
| H10     | AUGGAG  CAGGGCGG <u>GAUGA</u> UACAUUCGUGUGGACCG  CCC  |

太字と下線で示された部分が共通配列 (G/A-AUGA)。ランダム配列は”|”の記号で挟まれた部分。それぞれのアプタマーの全配列は 5'-GGAAGGAGAUUAUACCA-(表中の配列)-GACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'である。



表 3 SPR 法による L7KK との結合解析結果

| RNA sample ID | $k_{on}$ [/Ms]     | $k_{off}$ [/s]        | Kd [nM] |
|---------------|--------------------|-----------------------|---------|
| D12           | $4.15 \times 10^5$ | $6.42 \times 10^{-4}$ | 1.55    |
| G2            | $3.71 \times 10^5$ | $5.86 \times 10^{-4}$ | 1.58    |
| G6            | $3.81 \times 10^5$ | $7.01 \times 10^{-4}$ | 1.84    |
| G10           | $7.58 \times 10^5$ | $1.83 \times 10^{-4}$ | 0.241   |
| H1            | $5.53 \times 10^5$ | $8.00 \times 10^{-4}$ | 1.45    |
| H2            | $5.55 \times 10^5$ | $7.19 \times 10^{-4}$ | 1.30    |
| H5            | $5.43 \times 10^5$ | $2.81 \times 10^{-4}$ | 0.518   |
| H8            | $7.58 \times 10^5$ | $1.57 \times 10^{-4}$ | 0.207   |
| H10           | $4.22 \times 10^5$ | $4.34 \times 10^{-4}$ | 1.03    |

9 種類の RNA アプタマー (D12、G2、G6、G10、H1、H2、H5、H8、H10) の結合速度定数 ( $k_{on}$ )、解離速度定数 ( $k_{off}$ )、解離定数 (Kd) は、図 5 の測定曲線から BIAevaluation ソフトで計算した結果である。

表 4 SPR 法による L7KK との結合解析結果

| RNA sample ID | $k_{on}$ [/Ms]     | $k_{off}$ [/s]        | Kd [nM] |
|---------------|--------------------|-----------------------|---------|
| D12-1         | $2.07 \times 10^5$ | $5.15 \times 10^{-4}$ | 2.49    |
| D12-3         | $5.00 \times 10^5$ | $5.61 \times 10^{-4}$ | 1.12    |
| G2-1          | $2.40 \times 10^5$ | $6.77 \times 10^{-4}$ | 2.82    |
| G2-3          | $6.78 \times 10^5$ | $1.03 \times 10^{-3}$ | 1.51    |
| H5-1          | $5.46 \times 10^5$ | $8.31 \times 10^{-4}$ | 1.52    |
| H5-3          | $5.95 \times 10^5$ | $1.01 \times 10^{-3}$ | 1.69    |

D12、G2、H5 の一部分からなる RNA アプタマー (D12-1、D12-3、G2-1、G2-3、H5-1、H5-3) の結合速度定数 ( $k_{on}$ )、解離速度定数 ( $k_{off}$ )、解離定数 (Kd) は、図 8 の測定曲線から BIAevaluation ソフトで計算した結果である。D12-2、G2-2、H5-2 は L7KK との結合が検出されなかったため、各定数は求められていない。

## 第三章

### 考察

### 3-1 人工 RNP モジュールの取得について

本研究は L7Ae-C/D box RNP モジュールを改変、即ち L7Ae に変異を導入することで元の RNA 配列には弱く結合する L7Ae 変異体を作製し、次にこれに強く結合する新たな RNA 配列を選択することで、改変タンパク質と改変 RNA からなる新しい翻訳制御スイッチの作製を目的とした。まず L7Ae の 37 番目と 79 番目のリシンを両方アラニンに置換した L7A 変異体 (L7KK) を作製し、C/D box に対して弱い結合力を示すことを確かめた。次に L7KK に対して強く結合する RNA 配列のセレクションを行い、L7KK に強く結合する H23 アプタマーを取得した。しかしこのアプタマーは目的の一つとした強い特異性は示さず、L7KK だけでなく L7Ae にも強く結合することを確認した。最後に L7KK-H23 RNP モジュールで翻訳制御スイッチを作製し、HeLa 細胞内で設計通りに機能することを確認できた。

天然の RNP モジュールを改変して人工の RNP モジュールを作製する利点は、その X 線結晶構造から結合部位のアミノ酸と塩基が特定でき、それらを他のアミノ酸や塩基に置換することで結合力を変化できる点にある。今回取得した H23 アプタマーは L7KK と L7Ae の両方に結合することが確認できたが、この結合特性は L7KK が L7Ae の 2 つのアミノ酸のみをアラニンに置換した変異体であることに起因していると考えられる。つまり、置換したアミノ酸以外の共通アミノ酸部分で L7KK と L7Ae は H23 アプタマーに結合していると考えられる。この特徴を利用することで、L7KK または L7Ae のどちらか一方の存在で翻訳が抑制される翻訳制御スイッチである NOR ゲートを構築できたことから、本研究の手法を他の RNP モジュールに応用した場合でも、NOR ゲートを作製することが可能であると考えられる。

セレクションに用いた RNA のランダム配列は 30 塩基という比較的短い塩基数としたが、これは取得した 30 塩基のアプタマーを mRNA に挿入し翻訳制御スイッチを作製し

ように考えていたからである。挿入配列が長すぎる場合、その配列の挿入によって翻訳が強く抑制されてしまう可能性がある。したがって挿入配列を短くし、確実に翻訳制御スイッチを作製しようと考えた。今回は K-turn<sub>AUGA</sub> が存在すれば L7KK は結合することが確認できたので挿入配列を 24 塩基まで減らしたが、セレクションで得られた 30 塩基をそのまま挿入配列とすることでも翻訳制御スイッチは作製できたと考えられる。

30 塩基のランダム配列の取り得る配列数は  $1.15 \times 10^{18}$  ( $4^{30}$  通り) である。本研究のセレクションの 1 ラウンドでは 500pmol ( $3.01 \times 10^{14}$  個の分子) の RNA を使用しているため、30 塩基のランダム配列の総数に対して最大で約 0.026% の RNA を使用したことになる。したがって今回のセレクションでは H23 アプタマーが取得されたが、このアプタマーが最も強く L7KK に結合するアプタマーであるとは限らない。しかしセレクションで取得した H23 アプタマーを利用した翻訳制御スイッチが、HeLa 細胞内で設計通りに機能したことから、翻訳制御スイッチの種類を増やすという本研究の目的は H23 アプタマーの取得によって果たされたと言える。また、9 塩基から成る K-turn に限った場合、その取り得る配列数は  $2.62 \times 10^5$  ( $4^9$  通り) となるので、今回のセレクションに使用した RNA プールには、全ての K-turn 配列が含まれていた可能性は高いと考えられる。したがって今回のセレクションではランダム配列の数は 30 塩基以下でも十分であったと言える。

過去の研究で、RNA モチーフどうしの弱い相互作用を土台とすることで、標的 RNA に強く結合する RNA アプタマーが取得できることが報告されている<sup>61</sup>。したがって、今回のセレクションでは、L7KK がその K-turn 結合部位で RNA と相互作用することによって、L7KK の K-turn 非結合領域と RNA が近づき、その部分に結合する RNA が取得されることも考えられた。図 7 の D12-2、G2-2、H5-2 は、セレクションで得られた配列から K-turn を除いた配列であるので、これらはそのようなアプタマーである可能性があるが、図 8 の SPR 法により、L7KK には結合しないことが確認できた。今回は

K-turn のみで強く L7KK に結合できる RNA の結合が優先されたので、そのようなアプタマーは取得できなかったと考えられる。このようにアミノ酸変異を加えた部位に結合するアプタマーまたはその部位との弱い相互作用を利用して結合するアプタマーを得る可能性があるという点から、今回の手法はアプタマーを得る確率が比較的高い手法であると考えられる。

本手法は既存の RNP モジュールであれば原理的にはその全てに適用できると考えられる。したがって RNP モジュールを増やすためには本手法を別の RNP モジュールに適用すると同時に、RNA アプタマーの取得がされていないタンパク質に対してセクションを行い、新たな RNP モジュールを構築することも重要である。過去の研究では主に細胞表面のタンパク質や細胞外に分泌されるタンパク質に対して RNA アプタマーは取得されていたので<sup>50</sup>、今後は翻訳制御スイッチに利用できる RNP モジュールを増やすために、細胞内タンパク質に対する RNA アプタマーの取得も必要であると考えられる。また、そのような RNA アプタマーの取得には *in vitro* のセクションだけでなく、低分子応答リボスイッチの構築に使用された細胞内でのセクション<sup>48</sup> も利用できると考えられる。このように本手法とこれらのセクションを行うことで、今後はさらにタンパク質応答翻訳制御スイッチの種類を増やすことができると考えられる。

### 3-2 遺伝子発現制御スイッチ

L7KK-H23 RNP モジュールを利用した翻訳制御スイッチは、L7KK に応答して 80%以上翻訳を抑制することが確認できた (図 12E)。L7KK と C/D box の場合ではその抑制効果は約 40%であったことから (図 12E)、セクションによってより強く L7KK に結合するアプタマーを取得することで、抑制効果の高い翻訳制御スイッチを構築できることが示された。また、その抑制効果は L7Ae-C/D box RNP モジュールを使用した場合と同

程度であったことから（図 12E）、L7KK と L7Ae のどちらかの存在で遺伝子発現が抑制される NOR ゲートを構築できた。なお、L7KK または L7Ae を発現させていない細胞の蛍光は、C/D box-EGFP よりも H23-EGFP の方が低い結果となったが（図 12B-D）、これは開始コドン直後に挿入されたモチーフの配列の違いによって異なるアミノ酸が EGFP に付加されたことや、挿入配列の違いによる mRNA 構造の変化によって翻訳量に差が表れたことなどが原因であると考えられる。

過去の研究では転写因子または低分子応答リボスイッチを用いて NOR ゲートが構築されている<sup>54, 57, 58</sup>。ジンクフィンガー人工転写因子による NOR ゲートはその一つであるが、この人工タンパク質は DNA 結合ドメインであるジンクフィンガードメインと転写抑制ドメインである KRAB（Kruppel associated box）ドメインの融合タンパク質であり、DNA 結合配列が異なる 2 種類のジンクフィンガードメインを使用することで NOR ゲートが作製され、ヒト細胞内での遺伝子発現抑制効率は約 80%であることが示された<sup>52</sup>。また、別の研究ではテオフィリンとテトラサイクリンに応答する人工リボスイッチによって NOR ゲートが作製されたが、出芽酵母内での遺伝子発現抑制効率は約 80%であった<sup>59</sup>。したがって本研究で作製した L7KK と L7Ae に応答する NOR ゲートの遺伝子発現抑制効率は、過去に作製された NOR ゲートと同程度であると言える。

複雑な遺伝子回路の構築という合成生物学の目的の一つを達成するために、より多くの入力因子に応答する論理ゲートの作製も行われている<sup>53, 62</sup>。転写因子による AND ゲートを 3 つ使用することで、4 つの入力因子が存在する場合にのみ一つの出力因子を発現する論理ゲートはその例である<sup>53</sup>。L7Ae-C/D box RNP モジュールによる翻訳制御スイッチは転写制御と組み合わせることで、論理ゲートを作製できることが過去の研究で示されていることから<sup>56</sup>、L7KK-H23 RNP モジュールによる翻訳制御スイッチを使用しても同様の論理ゲートを作製できると考えられる。さらに本研究で示した NOR ゲートを転写因子による論理ゲートと組み合わせることで、三つ以上の入力因子に応答する論

理ゲートの作製も可能であると考えられる。

### 3-3 オルソゴナル性

特定の分子のみと相互作用し、その他の分子には非特異的な相互作用をしない性質をオルソゴナルと呼ぶ。遺伝子発現制御スイッチの開発ではこのオルソゴナル性が重視される<sup>63-65</sup>。それは細胞内でそのようなスイッチを機能させた時に、スイッチを形成する系と細胞内の別の系が非特異的な相互作用をし、意図しない結果が起こってしまうのを防ぐためである。L7Ae は C/D box が組み込まれた mRNA の翻訳を効果的に抑制する。しかし L7Ae はリボソーム RNA、核小体低分子 RNA やスプライソソーム RNA などの K-turn や K-loop に結合することが知られている<sup>36-38</sup>。したがって、L7Ae-C/D box RNP モジュールによる翻訳制御スイッチのオルソゴナル性は低いと言える。また本研究で得られた L7KK-H23 RNP モジュールは、H23 アプタマーが L7Kk だけでなく L7Ae にも結合することから、完全にオルソゴナルな RNP モジュールではないことを確認した。しかし、L7KK は K-turn<sub>AUGA</sub> には結合するが、その他の L7Ae 結合配列には結合しないことから (図 4)、L7KK の発現による他の系への非特異的な結合は L7Ae の場合よりも抑制されることが考えられる。完全にオルソゴナルな RNP モジュールを取得するためには、アミノ酸の電荷を正反対にする変異や、変異の数を増やしてセレクションを行うというように、今回の手法を改良することで達成できると考えられる。



## 材料と方法

### タンパク質精製

L7Ae 発現プラスミド (pL7Ae) は、Alexander Hüttenhofer 博士から譲り受けたプラスミドから L7Ae のコード配列をクローニングし、pET-28b<sup>+</sup>ベクター (Novagen) の制限酵素サイト *Nde* I と *Xho* I の間に挿入することで作製した。pL7Ae-K37K79A (L7KK) は、pL7Ae をテンプレートとして QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を使用することで作製した。タンパク質発現精製法は以下に示す。

まず、大腸菌 BL21 (DE3) pLysS に形質転換した。得られたコロニーを 25 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地 5 ml に植菌し、37°C で一晩振盪培養した。続いて培養液全量を 25 µg/ml カナマイシンを含む LB 培地 500 ml に植え継いだ。O.D.<sub>600</sub> が 0.4~0.6 になるまで 37°C で振盪培養し、1 M IPTG を 500 µl 加え (終濃度 1 mM)、30°C で一晩振盪培養した。遠心分離 (4 °C、6000 rpm、20 分) で菌体を回収し、ソニケーションバッファ (50 mM Na phosphate、0.3 M NaCl、pH 8.0) 5 ml を加え、超音波処理により、菌体を破碎した。なお、超音波処理は、氷上で冷却後、15 秒間超音波を当てる、という操作を 6 回繰り返した。その後、80°C 15 分で、不純タンパク質を変性させた (L7Ae は超好熱菌由来のタンパク質)。遠心分離 (4 °C、6000 rpm、20 分) により、上清を回収し、ヒスチジンタグが付いたタンパク質を Ni-NTA カラム (Qiagen) を用いて精製した。具体的には、まず上清と Ni-NTA 1 ml を混合し、4 °C、1 時間攪拌を行った。その後、カラムに充填し、wash バッファ (50 mM Na phosphate、0.3 M NaCl、20 mM imidazole、pH 8.0) 4 ml で 2 回洗浄した。50 mM、100 mM、200 mM、300 mM imidazole 溶出バッファ (50 mM Na phosphate、0.3 M NaCl pH 8.0 に imidazole を加えて作製) を各 1 ml、2 回で段階的に溶出させた。確認は 15% SDS-PAGE により行った。続いて、マイクロコン YM-3 (Millipore) を用いて、タンパク質の濃縮を行い、透析バッファ (20 mM

Hepes-KOH (pH 7.5)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM KCl、5% グリセロール) に置換した。また、タンパク質の濃度はプロテインアッセイ (BIO-RAD) を用い、Bradford 法で決定した。精製したタンパク質は 20 mM Hepes-KOH (pH7.4)、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM KCl、40% グリセロールで保存した。

### EMSA と SPR 法で使用した RNA の作製

RNA を作製するために使用した DNA テンプレートは北海道システムサイエンスまたはジーンデザインから購入した。DNA テンプレートに T7 オリゴヌクレオチド (5'-GCTAATACGACTCACTATA-3') をアニーリングさせることで T7 ポリメラーゼによる転写を行った。37°C で 4 時間インキュベートした後、TURBO DNase (MEGAscript<sup>TM</sup>、Ambion) を加え 37°C 15 分インキュベートすることでテンプレート DNA を分解した。RNA は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離し、ゲルから抽出したあと、フェノール抽出、ジエチルエーテル抽出、エタノール沈殿によって精製した。各 RNA の配列は以下の通りである。

H23

5'-GGGGAUGACGCGAAAGCUGACCC-3'

shH23

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGGGGGAUGACGCGAAAGCUGACCCCUGAAGUUCACCUUGAUGCCGA-3'

sh C/D box

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCUGACCCGAAAGGGCGUGAUGCUGAAGUUCACCUUGAUGCCAG-3'

D12

5'-GGAAGGAGAUAUACCAAUCGGGCACGGUCCAAGAUUUCGAUGAAUCCAGUCCUCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

G2

5'-GGAAGGAGAUAUACCAACGGGCCACCGGAAAAAGUGUAUGUCGAUGAGUUC  
CCCGGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

G6

5'-GGAAGGAGAUAUACCAUGGGGAACCGAUGAAGGAGCUUACCGGUGCCCUUC  
CCCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

G10

5'-GGAAGGAGAUAUACCAAUGCGUGCAAUACCAUGGGUGUGUCGAUGAUCUCC  
GCCGGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

H1

5'-GGAAGGAGAUAUACCAACGGGGGAAGACUCCCGGCAUAUCGAUGAACUCCAA  
GCCCCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

H2

5'-GGAAGGAGAUAUACCAACGGGGGUCGCGCUGACCACACACAAGUGGGAUGAC  
GCACGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

H5

5'-GGAAGGAGAUAUACCACGGGCAGCGAUGACCUGAUAAAAACUCAGUGAGCU  
CCCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

H8

5'-GGAAGGAGAUAUACCAAUGAGGCAAGAUACGCGGAGGUAGUCUCCCCAACC  
UCUCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

H10

5'-GGAAGGAGAUAUACCAAUGGAGCAGGGCGGGGAUGAUACAUUCGUGUGGACC  
GCCCCGACUCUAGAGGAUCCCCGG-3'

Kt-15

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCACUGAACCCGAAAGGGGAUGUGGUGAAGUUCAC  
CUUGAUGCCAG-3'

Kt-7

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCGGAGCCGAAAGGCGAAGAAGCUGAAGUUCA  
CCUUGAUGCCAG-3'

lysC lysine riboswitch

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGUGGAGACGAAAGUCUGUGAAACUGAAGUUCA  
CCUUGAUGCCAG-3'

SAM Kt (*B.subtilis*)

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCAGAGGCGAAAGCCGACGAAGCUGAAGUUCA  
CCUUGAUGCCAG

archaeal H/ACA

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCUGAUUGGUGAGGCUGAAGUUCACCUUGAUG  
CCAG-3'

sR8 C'/D' box

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCUGAGUCUGUGAUGCUGAAGUUCACCUUGAU  
GCCAG-3'

H23-L2-G

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGGGGGGUGACGCGAAAGCUGACCCCUGAAGUU  
CACCUUGAUGCCGA-3'

H23-L3-C

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGGGGGGACGACGCGAAAGCUGACCCCUGAAGUU  
CACCUUGAUGCCGA-3'

H23-1b-C

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGGGGGAUCACGCGAAAGCUGACCCCUGAAGUU  
CACCUUGAUGCCGA-3'

SAM Kt L3-U

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCAGCAGAGGCGAAAGCCGAUGAAGCUGAAGUUCAC  
CUUGAUGCCAG-3'

Kt-15-2b-A

5'-GGCAUCAAGGUGAACUUCACUGAACCCGAAAGGGGAUGAGGUGAAGUUCACC  
UUGAUGCCAG-3'

#### セレクション用 RNA プールの作製

以下の DNA テンプレートを使い（下線は T7 プロモータ配列）、KOD-PLUS-DNA ポリ  
メラーゼ（TOYOBO）で PCR を行うことによって転写用の DNA を作製した。

N30-a

5'CCGGGGATCCTCTAGAGTCGGG---N30---CCCCATTGGTATATCTCCTTCCTTATAGTGA  
GTCGTATTAGC

N30-b

5'GCTAATACGACTCACTATAGGAAAGGAGATATACCA3'

N30-c

5'CCGGGGATCCTCTAGAGTC3'

DNA を精製後、1-9 ラウンドの間は、セレクションによって回収される RNA の比率を  
計算するために、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP (PerkinElmer)存在下で転写し、RNA を RI ラベルした。10-14  
ラウンドの間は  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  GTP 非存在下で転写し、RNA は RI ラベルしなかった。RNA は  
前述と同じように精製した。

#### in vitro selection

セレクションで使用した buffer の組成は以下の通りである。

1×buffer: 20 mM Hepes-KOH (pH7.5)、150 mM KCl、1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、2 mM DTT、3% glycerol

elution buffer : 1×buffer の組成+100mM EDTA、1M imidazole

セレクションの手順を以下に示す。

RNA 溶液+タンパク質溶液 r.t. 30 min

1×buffer 100  $\mu\text{l}$  で wash 5 回

Elution buffer 200  $\mu\text{l}$  r.t. 5 min 上清除去

上清+1% SDS 溶液 22  $\mu\text{l}$  37°C 10min

フェノール 200 $\mu$ l、4°C 14,000rpm、5min  
ジエチルエーテル 300  $\mu$ l、4°C 14,000rpm、5 min  
25 $\mu$ l 3M NaOAc+625 $\mu$ l エタノール、-20°C、20 min  
4°C 14,000rpm、20 min 上清除去  
100 $\mu$ l MQ+10 $\mu$ l 3M NaOAc+300 $\mu$ l エタノール、-20°C、20 min  
4°C 14,000rpm、20 min  
風乾 10 min  
MQ 11 $\mu$ l に溶解

なお、セレクションには Ni-NTA magnetic agarose beads (QIAGEN) 10 $\mu$ l(上清は除去)を使用。1 $\times$ buffer 100 $\mu$ l で 2 回洗浄した後、MQ、5 $\times$ buffer、L7KK 溶液と混ぜて氷上 30 分をタンパク質溶液とした。RNA pool 溶液、tRNA (Roche) 100 $\mu$ g、5 $\times$ バッファーを混ぜ 80°C 5 分→25°C 処理したものを RNA 溶液とした。各セレクションに用いた RNA とタンパク質の量は表 1 の通りである。なおネガティブセレクションでは tRNA は加えていない。L7KK はヒスチジンタグ付き。magnetic tube stand を使って、溶液と beads を分離した。逆転写は以下の手順で行った。RNA 溶液 11 $\mu$ l、10 $\mu$ M N30-c 2 $\mu$ l、2mM dNTPs 25 $\mu$ l、5 $\times$ TRT buffer、RNase inhibitor 1 $\mu$ l、Rever Tra Ace (TOYOBO) 1 $\mu$ l を混合し、30°C 10 分→42°C 1 時間→99°C 5 分→4°C

### **Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

EMSA の反応溶液の容積は 20 $\mu$ l で、その溶液 buffer 組成は 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5)、150 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM DTT、3% グリセロールである。RNA は buffer に溶かし、80°C 3 分→4°C (徐冷) でフォールディングした後、タンパク質と混合し、氷上で 30 分、結合反応を行った。反応液中の RNA を 12% ネイティブ PAGE (ポリアクリルアミド電気泳動) で分離し、SYBR Green II で RNA を標識し、FLA-3000 または FLA-7000 (Fujifilm) で RNA バンドを検出した。

### 表面プラズモン共鳴法 (SPR 法)

BIAcore 3000 (GE Healthcare) を使用して測定した。溶液 buffer 組成は 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4)、150 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM DTT、5% glycerol、0.01% Tween-20、125 µg/ml tRNA、62.5 µg/ml BSA である。センサーチップ CM5 に L7KK または L7Ae を固定化した。その手順は、NHS/EDC 5µl/min 7min→0.13µM L7KK in AcONa (pH 4.6) 10µl/min 7min→Ethanolamine 5µl/min 7min である (固定化量約 1000RU (1RU は 1pg/mm<sup>2</sup>))。測定条件は Flow 20µl/min→Wait 60s→Kinject RNA 40ul 120s(解離時間)→Flow 60µl/min→Quickinject 0.1N NaOH 5µl→Extraclean→Wait 120s で行った。RNA は buffer に溶かし、96°C 5 分→室温でフォールディングした後、測定に使用した。

### 細胞実験用のプラスミド作製

L7KK または L7Ae 発現プラスミドはそれぞれの ORF を pIRES2-DsRed-Express (Clontech) に挿入し、OneStrep-L7Ae (L7KK)-myc-His-IRES-DsRed Ex をクローニング後、pcDNA5TO の *Hind*III と *Not*I の間に挿入することで作製した。pC/D box-EGFP と pH23-EGFP は、pEGFP-N1 (Clontech) をテンプレートとして whole-plasmid PCR を行うことで作製した。使用したプライマーは以下のとおりである。

pC/D box-EGFP 用 Fw プライマー

5'-GGGCGTGATGCGAAAGCTGACCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'

pH23-EGFP 用 Fw プライマー

5'-GGGGATGACGCGAAAGCTGACCCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'

Rev プライマー (共通) 5'-CATGGTGGCGACCGGTGGATC-3'

pH23-BFP は、pTagBFP-C (Evrogen) をテンプレートとして PCR し、pEGFP-N1 (Clontech) の *Bam*HI と *Not*I の間に挿入した (EGFP の ORF と BFP の ORF を入れ替えた)。

PCR で使用したプライマーは以下の通りである。

Fw プライマー

5'-GGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACCATGGGGGATGACGCGAAAGCTGACCCTAGC  
GAGCTGATTAAGGAGAACATGC-3'

Rev プライマー :

5'-TTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCTTTAGTGCCCCAGTTTGCTAGGGAG-3'

### HeLa 細胞内での翻訳制御

$1 \times 10^5$  cells / ml の HeLa 細胞溶液 (DMEM/F12 (10%FBS) (Invitrogen)) を 500  $\mu$ l ずつ 24 well プレートに播き ( $0.5 \times 10^5$  cells / well)、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベータで 24 時間培養。

### トランスフェクション

Lipofectamine2000 と Opti-MEM を 1:50 の比で混合 r.t. 5 min

Lipofectamin2000 溶液 60 $\mu$ l+DNA 溶液 (Opti-MEM) 60  $\mu$ l 混合し、r.t. 20 min  
培地交換 (DMEM/F12 (10%FBS) 500  $\mu$ l)

各 well に Lipofectamin2000-DNA 溶液を 100  $\mu$ l 加え、37°C、4h

培地交換 (DMEM/F12 (10%FBS) 500  $\mu$ l)、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベータで培養

### FACS 測定

培地を除去

PBS 500  $\mu$ l で洗浄

Trypsine-EDTA 100  $\mu$ l 37°C、3 min

DMEM/F12 (10%FBS)) 100 $\mu$ l 加え混合

FACS 測定 (FACS Aria (BD Bioscience)) 1 サンプルあたり 10000 個の細胞を解析

死細胞は FSC と SSC でゲートをかけることで除外した。



## 文献

1. Endy, D. Foundations for engineering biology. *Nature* **438**, 449-453 (2005).
2. Isaacs, F.J., Dwyer, D.J. & Collins, J.J. RNA synthetic biology. *Nature Biotechnol.* **24**, 545-554 (2006).
3. Purnick, P.E. & Weiss, R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 410-422 (2009).
4. Atsumi, S. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* **10**, 305-311 (2008).
5. Atsumi, S., Hanai, T. & Liao, J.C. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**, 86-89 (2008).
6. Shen, C.R. & Liao, J.C. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* **10**, 312-320 (2008).
7. Santos, C.N., Xiao, W. & Stephanopoulos, G. Rational, combinatorial, and genomic approaches for engineering L-tyrosine production in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 13538-13543 (2012).
8. Park, J.H., Lee, K.H., Kim, T.Y. & Lee, S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-valine based on transcriptome analysis and in silico gene knockout simulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7797-7802 (2007).
9. Martin, V.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. & Keasling, J.D. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat. Biotechnol.* **21**, 796-802 (2003).
10. Toettcher, J.E., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A. & Lahav, G. A synthetic-natural hybrid oscillator in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17047-17052 (2010).
11. Tigges, M., Marquez-Lago, T.T., Stelling, J. & Fussenegger, M. A tunable synthetic mammalian oscillator. *Nature* **457**, 309-312 (2009).
12. Stricker, J. et al. A fast, robust and tunable synthetic gene oscillator. *Nature* **456**, 516-519 (2008).
13. Davidson, E.A. & Ellington, A.D. Synthetic RNA circuits. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 23-28 (2007).

14. Liang, J.C., Bloom, R.J. & Smolke, C.D. Engineering biological systems with synthetic RNA molecules. *Mol. Cell* **43**, 915-926 (2011).
15. Cheah, M.T., Wachter, A., Sudarsan, N. & Breaker, R.R. Control of alternative RNA splicing and gene expression by eukaryotic riboswitches. *Nature* **447**, 497-500 (2007).
16. Wang, J.X., Lee, E.R., Morales, D.R., Lim, J. & Breaker, R.R. Riboswitches that sense S-adenosylhomocysteine and activate genes involved in coenzyme recycling. *Mol. Cell* **29**, 691-702 (2008).
17. Winkler, W., Nahvi, A. & Breaker, R.R. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**, 952-956 (2002).
18. Breaker, R.R. Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Mol. Cell* **43**, 867-879 (2011).
19. Ray, P.S. et al. A stress-responsive RNA switch regulates VEGFA expression. *Nature* **457**, 915-919 (2009).
20. Saito, H. & Inoue, T. RNA and RNP as new molecular parts in synthetic biology. *J. Biotechnol.* **132**, 1-7 (2007).
21. Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R. & Hillen, W. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1610-1614 (2004).
22. Topp, S. & Gallivan, J.P. Riboswitches in unexpected places--a synthetic riboswitch in a protein coding region. *RNA (New York, N.Y.)* **14**, 2498-2503 (2008).
23. Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 1425-1429 (1994).
24. Chen, Y.Y., Jensen, M.C. & Smolke, C.D. Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8531-8536 (2010).
25. Win, M.N. & Smolke, C.D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14283-14288 (2007).
26. Chang, A.L., Wolf, J.J. & Smolke, C.D. Synthetic RNA switches as a tool for temporal and spatial control over gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 679-688 (2012).
27. Saito, H., Fujita, Y., Kashida, S., Hayashi, K. & Inoue, T. Synthetic

- human cell fate regulation by protein-driven RNA switches. *Nature Commun.* **2**, 160 (2011).
28. Saito, H. et al. Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 71-78 (2010).
  29. Stapleton, J.A. et al. Feedback Control of Protein Expression in Mammalian Cells by Tunable Synthetic Translational Inhibition. *ACS Synth. Biol.* **1**, 83-88 (2012).
  30. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. & Steitz, T.A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920 (2000).
  31. Law, M.J., Rice, A.J., Lin, P. & Laird-Offringa, I.A. The role of RNA structure in the interaction of U1A protein with U1 hairpin II RNA. *RNA (New York, N.Y.)* **12**, 1168-1178 (2006).
  32. Nottrott, S., Urlaub, H. & Luhrmann, R. Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J.* **21**, 5527-5538 (2002).
  33. Schlueder, F. et al. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**, 615-623 (2000).
  34. Wimberly, B.T. et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339 (2000).
  35. Moore, T., Zhang, Y., Fenley, M.O. & Li, H. Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions; cocrystal structure of archaeal L7Ae and a box C/D RNA. *Structure* **12**, 807-818 (2004).
  36. Rozhdestvensky, T.S. et al. Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: a shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res.* **31**, 869-877 (2003).
  37. Charron, C. et al. The archaeal sRNA binding protein L7Ae has a 3D structure very similar to that of its eukaryal counterpart while having a broader RNA-binding specificity. *J. Mol. Biol.* **342**, 757-773 (2004).
  38. Bortolin, M.L., Bachellerie, J.P. & Clouet-d'Orval, B. In vitro RNP assembly and methylation guide activity of an unusual box C/D RNA, cis-acting archaeal pre-tRNA(Trp). *Nucleic Acids Res.* **31**, 6524-6535 (2003).
  39. Lilley, D.M. The structure and folding of kink turns in RNA. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **3**, 797-805 (2012).

40. Culler, S.J., Hoff, K.G. & Smolke, C.D. Reprogramming cellular behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins. *Science* **330**, 1251-1255 (2010).
41. Stripecke, R., Oliveira, C.C., McCarthy, J.E. & Hentze, M.W. Proteins binding to 5' untranslated region sites: a general mechanism for translational regulation of mRNAs in human and yeast cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5898-5909 (1994).
42. Ellington, A.D. & Szostak, J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818-822 (1990).
43. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-510 (1990).
44. Famulok, M., Hartig, J.S. & Mayer, G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chem. Rev.* **107**, 3715-3743 (2007).
45. Ng, E.W. et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 123-132 (2006).
46. Baines, I.C. & Colas, P. Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov. Today* **11**, 334-341 (2006).
47. Dua, P., Kim, S. & Lee, D.K. Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins. *Methods* **54**, 215-225 (2011).
48. Sinha, J., Reyes, S.J. & Gallivan, J.P. Reprogramming bacteria to seek and destroy an herbicide. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 464-470 (2010).
49. Wilson, D.S. & Szostak, J.W. In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 611-647 (1999).
50. Gopinath, S.C. Methods developed for SELEX. *Anal. Bioanal Chem.* **387**, 171-182 (2007).
51. Ayukawa, S. et al. Construction of a genetic AND gate under a new standard for assembly of genetic parts. *BMC Genomics* **11 Suppl 4**, S16 (2010).
52. Lohmueller, J.J., Armel, T.Z. & Silver, P.A. A tunable zinc finger-based framework for Boolean logic computation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5180-5187 (2012).
53. Moon, T.S., Lou, C., Tamsir, A., Stanton, B.C. & Voigt, C.A. Genetic programs constructed from layered logic gates in single cells. *Nature* **491**, 249-253 (2012).

54. Tamsir, A., Tabor, J.J. & Voigt, C.A. Robust multicellular computing using genetically encoded NOR gates and chemical 'wires'. *Nature* **469**, 212-215 (2011).
55. Xie, Z., Liu, S.J., Bleris, L. & Benenson, Y. Logic integration of mRNA signals by an RNAi-based molecular computer. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2692-2701 (2010).
56. Auslander, S., Auslander, D., Muller, M., Wieland, M. & Fussenegger, M. Programmable single-cell mammalian biocomputers. *Nature* **487**, 123-127 (2012).
57. Qi, L., Lucks, J.B., Liu, C.C., Mutalik, V.K. & Arkin, A.P. Engineering naturally occurring trans-acting non-coding RNAs to sense molecular signals. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5775-5786 (2012).
58. Sharma, V., Nomura, Y. & Yokobayashi, Y. Engineering complex riboswitch regulation by dual genetic selection. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16310-16315 (2008).
59. Win, M.N. & Smolke, C.D. Higher-order cellular information processing with synthetic RNA devices. *Science* **322**, 456-460 (2008).
60. Cruz, J.A. & Westhof, E. Sequence-based identification of 3D structural modules in RNA with RMDetect. *Nat. Methods* **8**, 513-521 (2011).
61. Shiohara, T., Saito, H. & Inoue, T. A designed RNA selection: establishment of a stable complex between a target and selectant RNA via two coordinated interactions. *Nucleic Acids Res.* **37**, e23 (2009).
62. Wang, B., Barahona, M. & Buck, M. A modular cell-based biosensor using engineered genetic logic circuits to detect and integrate multiple environmental signals. *Biosens. Bioelectron.* **40**, 368-376 (2012).
63. Alper, H., Fischer, C., Nevoigt, E. & Stephanopoulos, G. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12678-12683 (2005).
64. Mutalik, V.K., Qi, L., Guimaraes, J.C., Lucks, J.B. & Arkin, A.P. Rationally designed families of orthogonal RNA regulators of translation. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 447-454 (2012).
65. Salis, H.M., Mirsky, E.A. & Voigt, C.A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nat. Biotechnol.* **27**, 946-950 (2009).

## 謝辞

井上丹教授には研究の進め方、実験結果の解釈、論文の作成などについて多大な御指導を承りました。深く感謝いたします。齋藤博英准教授には論文の作成のご指導や実験についてのアドバイスを承り感謝いたしております。副指導教官の永尾雅哉教授には研究についての御意見を承りました。白石英秋准教授にはセミナー発表時に研究の問題点についての御指摘を承りました。藤田祥彦助教には細胞実験、FACS の使用法についての御指導、論文に対する御意見を承りました。遠藤慧博士には SPR 実験についての御指導や研究に対する御意見を承りました。大内将司博士には論文に対する御意見を承りました。林香倫氏には細胞実験の御指導を承りました。古島理恵氏には SPR 実験についての御指導を承りました。大野博久博士には研究生活面で世話になりました。井上研究室の皆様には共に研究を進める仲間として良い刺激を受けることができました、また研究環境の維持等ありがとうございました。最後に経済的、精神的に支えてくれた家族に深く感謝申し上げます。

2013 年 3 月 13 日 原 知明